



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ**

Διευθυντής: Καθηγητής ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ Ε. ΓΕΡΜΕΝΗΣ



Διδακτορική Διατριβή

" ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΟΥ TGF- β

ΣΤΗΝ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ

ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΙΝΩΣΗΣ "

υπό

ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ Α. ΣΤΑΥΡΟΠΟΥΛΟΥ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2013

1

© 2013 Αθανάσιος Σταυρόπουλος

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (1^ο/21-02-2013 ΓΣΕΣ):

- 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)** Δρ. Αναστάσιος Ε. **Γερμενής Αναστάσιος**
Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ματθαίος **Σπελέτας**
Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογία, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** Δρ. Πασχάλης **Σιδεράς**
Ερευνητής Α, Κέντρο Ανοσολογίας και Μεταμοσχεύσεων, Ίδρυμα
Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών
- 4^{ος} Εξεταστής** Δρ. Κωνσταντίνος **Γουργουλιάνης**
Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Δρ. Κωνσταντίνος **Ρίτης**
Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο
Θράκης
- 6^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ουρανία **Τσιτσιλώνη**
Επίκουρη Καθηγήτρια Ανοσολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 7^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ευθυμία **Πετεινάκη**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Βιοχημείας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης διατριβής, ένα σύνολο ανθρώπων συνέβαλαν ποικιλοτρόπως, τους οποίους και θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Θα αρχίσω αναφέροντας αυτούς που συνέδραμαν με την ευγενική τους προσφορά σε υλικά απαραίτητα για την πραγματοποίηση των αναφερόμενων πειραμάτων. Τον Dr. Peter Ten Dijke για την προσφορά του πλασμιδιακού φορέα pGL3-caga-Luc, την Dr. Christine Mummeγ για την προσφορά του πλασμιδιακού φορέα pGL3-CMVe-caga-eGFP, τον Δρ. Βασιλόπουλο Γεώργιο για την προσφορά του πλασμιδιακού φορέα pVZc-HS4 και την Dr. Anna-Katerina Hadjantonakis για την προσφορά του πλασμιδιακού φορέα pCx-mRfp1.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της μονάδας Μικροσκοπίας του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. Δρ. Παγκάκη Σταμάτη και Δρ. Ρηγανά Ελένη για τη βοήθεια τους στη λήψη των φωτογραφιών ανοσοφθορισμού.

Οι μεταδιδακτορικοί ερευνητές Dr. Ethan Ford και Dr. Matthieu Lavigne από το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Κέντρου Βασικής Έρευνας του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. συνέβαλαν στην εκπαίδευσή μου στην τεχνολογία RNA-Seq και στην ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση αυτής.

Οι συνάδελφοι Δρ. Γαβριήλ Αριάνα και Αποστολλίδου Αναστασία, μέλη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του Κέντρου Ανοσολογίας και Μεταμοσχεύσεων του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α., συνέβαλαν στην απομόνωση των υπό μελέτη κυτταρικών πληθυσμών με τη χρήση του κυτταροδιαχωριστή και στη συνεχή αναβάθμιση των τεχνικών και πρωτοκόλλων κυτταροδιαχωρισμού.

Η Δρ. Κατσαντώνη Ελένη από το Εργαστήριο Αιματολογίας του Κέντρου Βασικής Έρευνας του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. συνέβαλε στην εκπαίδευσή μου στις τεχνικές Μοριακής Βιολογίας και στο σχεδιασμό της στρατηγικής για τη δημιουργία των TRE-RFP διαγονιδιακών σειρών, ενώ ο John Kong a San (Erasmus M.C., Rotterdam, The Netherlands) πραγματοποίησε τις μικροενέσεις σε γονιμοποιημένα ωάρια, για τη δημιουργία των TRE-RFP διαγονιδιακών σειρών.

Καταλυτική ήταν και η συμβολή του συνόλου των ατόμων του Κέντρου Ανοσολογίας και Μεταμοσχεύσεων του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. Θα ξεχωρίσω τη συμβολή του Δρ. Σουντουλίδη

Αλέξανδρου από το Εργαστήριο Ανοσολογίας, που με την επιμονή του και τη λεπτομερή ανάλυση της BRE-eGFP διαγονιδιακής σειράς συνέβαλε καθοριστικά στην κατανόηση και χαρακτηρισμό των υπό μελέτη διαγονιδιακών συστημάτων. Η μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Γαλάνη Ιωάννα από το εργαστήριο Ανοσογενετικής, παρείχε πολύτιμη υποστήριξη στη διαδικασία κυτταροδιαχωρισμού των υπό μελέτη πληθυσμών. Ευχαριστώ επίσης τις υποψήφιες διδάκτορες Αποστόλου Ειρήνη από το Εργαστήριο Ανοσολογίας, Πυρρίλου Κατερίνα και Χαιρακάκη Κατερίνα από το Εργαστήριο Ανοσογενετικής, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Περβολαράκη Καλλιόπη και Διβόλη Γεώργιο, τους συναδέλφους Πασχίδη Κωσταντίνο και Δούλου Αθανασία, καθώς και τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές Γιαγλή Σταύρο από το Εργαστήριο Ανοσολογίας και Σαλαγιάννη Μαρία από το Εργαστήριο Ανοσογενετικής, για το γόνιμο επιστημονικό διάλογο.

Ευχαριστώ το Δρ. Ανδρέακο Ευάγγελο, επικεφαλή του εργαστηρίου Ανοσογενετικής του Κέντρου Ανοσολογίας και Μεταμοσχεύσεων, για τη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια και την επιστημονική και οικονομική υποστήριξη που παρείχε κατά την εκτέλεση της παρούσας διατριβής. Ο πλουραλισμός γνώσεων που τον διακατέχει συνέβαλε στην επιστημονική μου κατάρτιση.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής κρίσης της παρούσας διατριβής, Δρ. Γερμενή Αναστάσιο και Δρ. Σπελέτα Ματθαίο από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που μου έδωσαν την ευκαιρία να εκτελέσω τη συγκεκριμένη εργασία και για τα πολύτιμα σχόλια τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τρία άτομα, των οποίων η ευεργετική επίδραση, τόσο επιστημονικά όσο και προσωπικά, δεν μπορεί να περιγραφεί σε λίγες γραμμές. Την αδερφή μου Ειρήνη, που με την ηθική και οικονομική της υποστήριξη και το ακούραστο ενδιαφέρον για την πορεία μου συνέβαλε τα μέγιστα στο να βρίσκομαι εδώ που είμαι τώρα. Τον Διευθυντή του Κέντρου Ανοσολογίας και Μεταμοσχεύσεων και επιστημονικό υπεύθυνο της παρούσας διατριβής, Δρ. Πασχάλη Σιδερά. Η σχέση μας ξεπερνά τα στενά επαγγελματικά όρια διευθυντή-υφιστάμενου ή Καθηγητή-φοιτητή, αφού η απλότητα που τον διακατέχει οδήγησε στη δημιουργία μιας εγκάρδιας και ειλικρινούς φιλίας. Υπήρξε ο επιστημονικός μου καθοδηγητής όλα αυτά τα χρόνια, μεταφέροντάς μου με πάθος τη γνώση της επιστημονικής έρευνας και την επιμονή στην ποιότητα των αποτελεσμάτων, ενώ οι

καθημερινές μας συζητήσεις (και πολλές φορές συγκρούσεις) συνέβαλλαν καθοριστικά στην επιστημονική μου ωρίμανση. Τη Μαρία, σύντροφο της ζωής μου, την άφησα τελευταία, μιας και αυτή είναι που συμπληρώνει τη ζωή μου με την αγαστή της υποστήριξη, αποτελώντας πάντα έναν καλό ακροατή για να συζητήσω τους επιστημονικούς και προσωπικούς μου προβληματισμούς.

Σας ευχαριστώ όλους!

Αθανάσιος Σταυρόπουλος

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ: ΣΤΑΥΡΟΠΟΥΛΟΣ
ΟΝΟΜΑ: ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ
ΕΤΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 1977
ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ: ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: ΣΕΡΙΦΟΥ 10, 15562, ΧΟΛΑΡΓΟΣ
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: 210 – 6597001, 6977178750

ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2007- Υποψήφιος Διδάκτωρ. Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2006 Μεταπτυχιακός Κύκλος Σπουδών : ‘Μοριακή Ιατρική και Ανοσολογία ,από την Βασική Έρευνα ,στη Κλινική Εφαρμογή’
2000 Πτυχίο Τεχνολόγου Ιατρικών Εργαστηρίων, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας, Τ.Ε.Ι. Αθήνας, με βαθμό 9.17 (‘άριστα’).
1995 Απολυτήριο Λυκείου Θέρμου Αιτ/νίας με βαθμό 18.9 (‘άριστα’).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1)	<i>Sideras P, Apostolou E, Stavropoulos A, Sountoulidis A, Gavriil A, Apostolidou A, Andreakos E.</i> Activin, neutrophils, and inflammation: just coincidence? <i>Semin Immunopathol. 2013 Feb 6</i>
2)	<i>Sountoulidis A, Stavropoulos A, Giaglis S, Apostolou E, Monteiro R., de Sousa Lopes S.M.C, Chen H, Stripp B.R., Mummery C, Andreakos E, Sideras P</i> Activation of the Canonical Bone Morphogenetic Protein (BMP) Pathway during Lung Morphogenesis and Adult Lung Tissue Repair. <i>PLoS One. 2012;7(8):e41460.</i>
3)	<i>Apostolou E, Stavropoulos A, Sountoulidis A, Xirakia C, Giaglis S, Protopapadakis E, Ritis K, Mentzelopoulos S, Pasternack A, Foster M, Ritvos O, Tzelepis GE, Andreakos E, Sideras P.</i> Activin-A Over-Expression in the Murine Lung Causes Pathology that Simulates Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). <i>Am J Respir Crit Care Med. 2011 Dec 8</i>
4)	<i>Koltsida O, Hausding M, Stavropoulos A, Koch S, Tzelepis G, Ubel C, Kotenko SV, Sideras P, Lehr HA, Tepe M, Klucher KM, Doyle SE, Neurath MF, Finotto S, Andreakos E.</i> IL-28A (IFN-λ2) modulates lung DC function to promote Th1 immune skewing and suppress allergic airway disease. <i>EMBO Mol Med. 2011 Jun;3(6):348-61.</i>

5)	<i>Xirakia C, Koltsida O, Stavropoulos A, Thanassopoulou A, Aidinis V, Sideras P, Andreakos E.</i> Toll-like receptor 7-triggered immune response in the lung mediates acute and long-lasting suppression of experimental asthma <i>Am J Respir Crit Care Med. 2010 Jun 1;181(11):1207-16</i>
6)	<i>Andreakos E, Rauchhaus U, Stavropoulos A, Endert G, Wendisch V, Benahmed AS, Giaglis S, Karras J, Lee S, Gaus H, Bennett CF, Williams RO, Sideras P, Panzner S.</i> Amphoteric liposomes enable systemic antigen-presenting cell-directed delivery of CD40 antisense and are therapeutically effective in experimental arthritis. <i>Arthritis Rheum. 2009 Apr;60(4):994-1005.</i>
7)	<i>Roubelakis MG, Martin-Rendon E, Tsaknakis G, Stavropoulos A, Watt SM.</i> The murine ortholog of the SHP-2 binding molecule, PZR accelerates cell migration on fibronectin and is expressed in early embryo formation <i>J Cell Biochem. 2007 Nov 1;102(4):955-69.</i>

ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1) **Athanasios Stavropoulos**, Alexandros Soundoulidis, Eleni Katsantoni, Evangelos Andreakos and Paschalis Sideras
“TGF-β Superfamily signaling during lung morphogenesis and adult tissue repair”
22nd ETRS Annual Meeting, Athens, Greece
October 4-5, 2012
- 2) **Athanasios Stavropoulos**
“TGF-β Superfamily signaling during lung morphogenesis and adult tissue repair”
Oral presentation. 10th ERS Lung Science Conference, Estoril, Portugal,
30th March – 31th March 2012
- 3) **Athanasios Stavropoulos**, Alexandros Soundoulidis, Eleni Katsantoni, Christine Mummery, Anastasia Apostolidou, Evangelos Andreakos and Paschalis Sideras
“Global analysis of the canonical TGF-beta and BMP signaling pathway in-vivo”
3rd Summer School Of Immunology, Anargyrios and Korgialenios School of Spetses,
Spetses Island, Greece, 27th June – 1st July 2011
- 4) Alexandros Sountoulidis, **Athanasios Stavropoulos**, Stavros Giaglis, Irene Apostolou, Rui Monteiro, Christine Mummery, Evangelos Andreakos and Paschalis Sideras
“BMP signaling during lung morphogenesis and adult lung tissue repair”
3rd Summer School Of Immunology, Anargyrios and Korgialenios School of Spetses,
Spetses Island, Greece, 27th June – 1st July 2011
- 5) A. Sountoulidis, **A. Stavropoulos**, S. Giaglis, R. Monteiro, E. Aza, A. Apostolidou, E. Protopapadakis, C. Mummery, E. Andreakos, P. Sideras
“BMP mediated signaling during fetal lung development and adult lung tissue repair”
9th Annual Meeting of the Hellenic Research Club for Connective Tissue & Matrix
Biology
Athens 10-12 May 2007
- 6) C. Xirakia, I. Apostolou, **A. Stavropoulos**, S. Giaglis, A. Sountolidis, E. Aza, K. Pashidis, A. Gavriil, G. Tzelepis, E. Andreakos, E. Protopapadakis, P. Sideras
“Entopic expression of activin-a in the adult murine lung induces severe pulmonary

inflammation and fibrosis”

9th Annual Meeting of the Hellenic Research Club for Connective Tissue & Matrix Biology

Athens 10-12 May 2007

- 7) *E. Andreakos, U. Rauchhaus, A. Stavropoulos, C. Xirakia, R. Williams, P. Sideras, S. Panzner*

“Anti-inflammatory activity of liposomal CD40 antisense oligonucleotide in a model of rheumatoid arthritis”

XIV Annual Congress of the European Society of Gene Therapy

Athens 9-12 November 2006

- 8) *E. Andreakos, U. Rauchhaus, A. Stavropoulos, D. Mastellos, C. Xirakia, A. Gavriil, R. Williams, S., Panzner, P. Sideras*

“Systemic delivery of CD40 antisense oligonucleotide and treatment of established collagen-induced arthritis, by a novel, charge reversible, liposomal formulation”

26th European Workshop for Rheumatology Research

Heraklion-Crete 23-26 February 2006

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1) 2012 InteGeR Conference
Eugenides Foundation, Athens 14-16 November 2012
- 2) 22nd ETRS Annual Meeting
Athens 4-5 October 2012
- 3) 3rd Summer School Of Immunology
Anargyrios and Korgialenios School of Spetses,
Spetses Island, Greece, 27th June – 1st July 2011
- 4) 2nd Immunology Summer School & Conference,
Fiscardo, Kefalonia, 31 August-4 September 2009.
- 5) International Workshop on Autoimmunity
Αθήνα 25/5/07 έως 27/5/07
- 6) 6th Transgenic Technology Meeting
Βαρκελώνη (Ισπανία) 11/9/05 έως 13/9/05
- 7) 1st East Mediterranean Regional ICLAS Symposium on Laboratory Animal Science
Αθήνα 30/5/05 έως 31/5/05
- 8) 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου.
Αθήνα 30/11/00 έως 3/12/00.
- 9) 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρολογίας.
Αθήνα 15-27/05/00.
- 10) 2^ο Εθνικό Συνέδριο AIDS και Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων.
Αθήνα 22-25/04/99.
- 11) 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS.
Αθήνα 19-29/11/98.
- 12) 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρολογίας.
Αθήνα 26-28/03/98.
- 13) 25^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού.
Αθήνα 19-22/03/98.
- 14) 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικών Λοιμώξεων.

Αθήνα 5-7/12/97.

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- 1) Έπαινος για την αποφοίτηση από τη Σχολή Επαγγελματιών Υγείας Πρόνοιας του ΤΕΙ Αθήνας με την απόδοση της υψηλότερης ετήσιας βαθμολογίας 9.17. 12/10/2000
- 2) Αριστείο προόδου από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) για το Ακαδημαϊκό έτος 1997-1998.
- 3) Χρηματικό βραβείο 80.000 δρχ. από το Ι.Κ.Υ. λόγω αριστείας κατά το Ακαδημαϊκό έτος 1997-1998.
- 4) Χρηματική υποτροφία 150.000 δρχ. από το Ι.Κ.Υ. για τα Ακαδημαϊκά έτη 1997, 1999.
- 5) Χρηματική υποτροφία 400.000 δρχ. από το Ι.Κ.Υ. για το Ακαδημαϊκό έτος 1997-1998.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 01/08/03 – Ειδικός Τεχνικός Επιστήμονας. Κέντρο Ανοσολογίας – Μεταμοσχεύσεων. Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.
- 02/03/03 – 30/06/03 Ανάλυση ερευνητικού έργου με τίτλο: Δημιουργία και χαρακτηρισμός διαγονιδιακών μοντέλων νευροανοσολογικών ασθενειών του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΝΓΚ
- 02/09/02 – 01/03/03 Ανάλυση ερευνητικού έργου με τίτλο: Διαχείριση διαγονιδιακών ποντικών. Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΝΓΚ
- 17/02/02 – 22/05/02 Αιματολογικό και Βιοχημικό Εργαστήριο του 401 ΓΣΝΑ και Ανοσολογικό Τμήμα Ερευνητικής Μονάδας 401 ΓΣΝΑ.
- 13/05/01 – 13/02/02 Υπεύθυνος του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του 79 Τάγματος Υγειονομικού Εθνοφυλακής. Σάμος.
- 09/04/01 – 04/05/01 Ανοσολογικό Εργαστήριο του 401 ΓΣΝΑ.
- 11/12/00 – 29/12/00 Μεταπτυχιακή πρακτική άσκηση στο Εθνικό Ίδρυμα Αποκατάστασης Αναπήρων – Μονάδα Βιοϊατρικής και Τεχνολογίας Αποκατάστασης.
- 01/04/00 – 30/09/00 Προπτυχιακή πρακτική άσκηση στο εργαστήριο Ραδιοδεσμευτικών Αναλύσεων του τμήματος Πυρηνικής Ιατρικής του Θεραπευτικού Κέντρου Αθηνών 'ΥΓΕΙΑ'.

**" ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΟΥ TGF- β
ΣΤΗΝ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ
ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΚΑΙ ΙΝΩΣΗΣ "**

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΣΤΑΥΡΟΠΟΥΛΟΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Αναστάσιος Ε. Γερμενής**, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- **(Επιβλέπων)**
2. **Δρ. Ματθαίος Σπελέτας**, Αναπληρωτής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογία, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Πασχάλης Σιδεράς**, Ερευνητής Α', Διευθυντής Κέντρου Ανοσολογίας και Μεταμοσχεύσεων. Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Περίληψη

Πλήθος μελετών με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων ζωικών μοντέλων έχει αναδείξει τη σημασία της υπερ-οικογένειας του παράγοντα TGF-β στην ανάπτυξη, την ομοιόσταση και την παθοφυσιολογία του οργανισμού, κατ' αντιστοιχία με μελέτες που καταδεικνύουν το φυσιολογικό και παθολογικό ρόλο της υπερ-οικογένειας του TGF-β στον άνθρωπο. Παρόλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός δράσης, οι κυτταρικοί στόχοι, το γονιδιακό πρότυπο έκφρασης και το χωροχρονικό πρότυπο κατανομής των κυττάρων-δεκτών της σηματοδότησης από τους BMPs ή τους TGF-β/Ακτιβίνες, δεν έχουν διαλευκανθεί ακόμα.

Για να προσεγγίσουμε αυτά τα ερωτήματα, δημιουργήσαμε και αναλύσαμε δυο διαγονιδιακές σειρές μυών αναφοράς, μια που εκφράζει την πρωτεΐνη eGFP υπό τον έλεγχο ενός BMP-αποκρινόμενου υποκινητή (BRE-eGFP διαγονιδιακή σειρά) για την ανίχνευση των κυτταρικών στόχων του κανονικού BMP-μονοπατιού και μια νέα διαγονιδιακή σειρά, που εκφράζει την πρωτεΐνη mRFP κάτω από τον έλεγχο ενός TGF-β/Activin-αποκρινόμενου υποκινητή (TRE-mRFP διαγονιδιακή σειρά). Συνδυάζοντας αυτές τις σειρές, η ανάλυση των διπλά διαγονιδιακών μυών αναφοράς επέτρεψε τη συνεχή και ταυτόχρονη παρακολούθηση και των δύο σηματοδοτικών μονοπατιών.

Ανάλυση διαφόρων οργάνων αποκάλυψε τους κυτταρικούς στόχους της σηματοδότησης από την υπερ-οικογένεια του TGF-β, ενώ ταυτόχρονα επιβεβαιώθηκε η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών αυτών μονοπατιών σε καταστάσεις φλεγμονής και ιστικής βλάβης, αναδεικνύοντας τη σημασία αυτών των μορίων, όχι μόνο στην ομοιόσταση αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις.

Τέλος, κατέστη δυνατή η απομόνωση των κυτταρικών στόχων του BMP- και TGF-β/Activin-μονοπατιού στο ενήλικο ήπαρ και η εν τω βάθος ανάλυση του γονιδιακού προτύπου έκφρασης αυτών των κυτταρικών πληθυσμών, επιτρέποντας έτσι για πρώτη φορά τη διερεύνηση νέων γονιδίων-στόχων της TGF-β υπερ-οικογένειας.

Η μελέτη αυτή ανέδειξε την πολυπλοκότητα και δυναμικότητα της ενεργοποίησης του TGF-β σηματοδοτικού μονοπατιού κατά την ανάπτυξη, την ομοιόσταση και την ιστική αναδόμηση και ανέπτυξε μοναδικά εργαλεία που επιτρέπουν την απομόνωση των κυττάρων που βρίσκονται κάτω από τη δράση αυτού του σηματοδοτικού μονοπατιού.

Abstract

Numerous studies in genetically modified animals have demonstrated the significance of the TGF- β superfamily in development, homeostasis and disease, with a strong relevance in human homeostatic and pathological conditions. However, the precise mechanism of action, the actual cellular targets, the gene expression profile and the spatio-temporal pattern of BMP- and/or TGF β /Activin-signalling during these processes remains poorly outlined.

To address these issues, we utilised two different transgenic mouse lines, one expressing eGFP under the control of a BMP-responsive element (BRE-eGFP line) to directly visualize initiation of the canonical BMP-pathway, and a recently developed novel transgenic line expressing mRFP under the control of a TGF β /Activin-responsive element (TRE-mRFP line).

Crossing of these animals and development of double reporter mice allowed us to simultaneously monitor the BMP and TGF β /Activin signalling in the same tissues. We also confirmed the reactivation of these signaling pathways in inflammation and tissue damage, demonstrating the importance of these molecules, not only in homeostasis but also in pathological conditions.

These animal models provide a unique opportunity to isolate specific cell populations under the control of these pathways, like adult hepatocytes, the cellular type that has been selected in this study for transcriptomic analysis, enabling the identification of new gene targets of the TGF- β superfamily.

Analysis of these animals unveils a far more complex and dynamic activation pattern for the TGF- β superfamily signalling system during development, homeostasis and tissue repair than previously anticipated and construct a functional spatiotemporal map for this signalling system in health and disease.

Συντομογραφίες

ActRIB	Activin Receptor Type 1B
AFP1	Anti-alpha 1 Fetoprotein
ALK	Activin receptor-like Kinase
AMH	Anti-Müllerian Hormone
aSMA	Actin a-smooth muscle
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BRE	BMP Responsive Element
BSA	Bovine Serum Albumin
CBP	CREB-binding Protein
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CK19	Cytokeratin 19
CK5	Cytokeratin5
CK8	Cytokeratin8
CMVe	Cytomegalovirus enhancer
Col1	Collagen1
ConA	Concanavalin A
C-Ski	C-Sloan-Kettering Institute protein
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DESeq	Differential expression analysis for sequence count data
DLK	Delta-Like 1 homolog
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPC4	Deleted in Pancreatic Carcinoma, locus 4
DsRed	Discosoma Red Fluorescent Protein
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epithermal Growth Factor
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
Erk	extracellular signal-regulated kinase
EtBr	Ethidium Bromide
FAST	Forkhead Activin Signal Transducer
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF10	Fibroblast Growth Factor 10
FSP-1	Fibroblast-Specific Protein 1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GDF	Growth and Differentiation Factor
GS	Glutamine Synthase
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution

HDACs	Histone deacetylases
HeLa cells	Henrietta Lacks cells
HGF	Hepatic Growth Factor
HRP	Horse Radish Peroxidase
HS4 insulator	5'-HS4 chicken β -globin insulator
HSC	Hepatic Stellate Cells
IL-10	Interleukin 13
IL-13	Interleukin 13
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LAP	Latency-Associated Peptide
Lyz	Lysozyme
M.F.I.	Mean Fluorescence Intensity
Mad	mother against dpp
Mapk	Mitogen-activated protein kinases
MAPKK/MEK	mitogen activated protein kinase kinase
MHC Class II	Major Histocompatibility Complex Class II
MLP	Adenovirus Major Late Promoter
MMPs	Matrix MetalloProteinases
mRFP	monomeric Red Fluorescent Protein
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
O.D.	Optical Density
OCT medium	Optimum Cutting Temperature medium
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
pro-SpC	Prosurfactant Protein C
Raf-1	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1
Ras	Rat sarcoma
RGM	Repulsive Guidance Molecule
RhoA	Ras homolog gene family, member A
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SARA	Smad Anchor for Receptor Activation
sbe	smad binding element
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Smurf	Smad ubiquitination regulatory factor
SnoN	Ski-related novel gene
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBS-T	Tris-buffered saline-Tween-20
TGF- β	Transforming Growth Gactor beta
TGIF	TG-interacting Factor
Th2	T helper type2
TIMPs	Tissue Inhibitors of MetalloProteinases

TRE	TGF- β Responsive Element
T β RI	TGF- β receptor type I
T β RII	TGF- β receptor type II
Uea1	Ulex Europaeus Agglutinin 1

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες	4
Βιογραφικό Σημείωμα	7
Περίληψη	12
Abstract	13
Συντομογραφίες	14
Πίνακας Περιεχομένων	17

Γενικό Μέρος

Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή

1.1	Η υπερ-οικογένεια αυξητικών παραγόντων μεταμόρφωσης, TGF-β	21
1.2	Τα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF-β	26
1.3	Διαμεμβρανικοί υποδοχείς των κυτταροκινών της TGF-β υπερ-οικογένειας	28
1.4	Ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω των Smads	30
1.5	Ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω εναλλακτικών (μη Smad) μονοπατιών	35
1.6	Ο ρόλος της υπερ-οικογένειας του TGF-β στην ανάπτυξη και την παθοφυσιολογία του πνεύμονα	35
1.7	Ο ρόλος της υπερ-οικογένειας του TGF-β στην ανάπτυξη και την παθοφυσιολογία του ήπατος	39

Κεφάλαιο 2	Σκοπός της παρούσας Μελέτης	42
------------	-----------------------------	----

Ειδικό Μέρος

Κεφάλαιο 3 Υλικά

3.1	Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιιεργειών	45
3.2	Περιοριστικά ένζυμα, βιολογικά και χημικά αντιδραστήρια μοριακών αναλύσεων	45
3.3	Ένζυμα πέψης του πνευμονικού και ηπατικού ιστού	47
3.4	Αναισθητικά και ουσίες επαγωγής ιστικής βλάβης	48
3.5	Αλληλουχίες εκκινητών	48
3.6	Αντισώματα	48
3.7	Εργαστηριακός εξοπλισμός	50
3.8	Διαλύματα εργασίας	51

Κεφάλαιο 4 Μέθοδοι

4.1	Πειραματόζωα	53
4.2	Κλωνοποιήσεις-Πλασμιδιακές πέψεις-Ανάπτυξη βακτηρίων-Απομόνωση	53

	πλασμιδίων	
4.3	Καλλιέργεια της HeLa κυτταρικής σειράς. Διαμόλυνση της με πλασμιδιακούς φορείς	54
4.4	Κυτταρομετρία ροής – Κυτταροδιαχωρισμός	55
4.5	Ανίχνευση γενετικού υλικού κατά Southern	58
4.6	Απομόνωση DNA - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	61
4.7	Απομόνωση RNA – cDNA σύνθεση - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου	64
4.8	Ανοσοσύπωμα κατά Western	69
4.9	Ιστολογία-Ανοσοφθορισμός	76
4.10	Απομόνωση πνευμονοκυττάρων και ηπατοκυττάρων με ενζυμική πέψη	78
4.11	Ζωικά μοντέλα πνευμονικής βλάβης	80
4.12	Ζωικά μοντέλα ηπατικής βλάβης	81
4.13	Δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών	81
4.14	Αλληλούχιση cDNA βιβλιοθηκών	83
4.15	Βιοπληροφορική Ανάλυση	83
4.16.	Στατιστική Ανάλυση	84

Κεφάλαιο 5 Αποτελέσματα.

5.1	Δημιουργία της διαγονιδιακής κατασκευής	85
5.2	Έλεγχος της διαγονιδιακής κατασκευής στην κυτταρική σειρά HeLa	94
5.3	Δημιουργία των TRE-RFP διαγονιδιακών σειρών μυών	95
5.4	Επιλογή της διαγονιδιακής σειράς με την υψηλότερη έκφραση	96
5.5	Σύγκριση του προτύπου έκφρασης του RFP στα όργανα των F6 και F1 διαγονιδιακών σειρών	97
5.6	Έλεγχος των επιπέδων pSmad2 στα RFP ⁺ και RFP ⁻ κύτταρα του πνεύμονα	98
5.7	Διασταύρωση της TRE-RFP διαγονιδιακής σειράς με τη BRE-eGFP	100
5.8	Ιστολογική ανάλυση της έκφρασης των διαγονιδίων σε βασικά όργανα ενήλικων TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακών μυών	101
5.9	Χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης των διαγονιδίων κατά την ανάπτυξη και ομοιόσταση του πνεύμονα των TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακών μυών	103
5.10	Έκφραση των διαγονιδίων σε ζωικά μοντέλα πνευμονικής βλάβης	108
5.11	Χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης των διαγονιδίων κατά την ανάπτυξη και ομοιόσταση του ήπατος των TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακών μυών	113
5.12	Έκφραση των διαγονιδίων σε ζωικά μοντέλα ηπατικής βλάβης	118
5.13	Μεταγραφική ανάλυση των ηπατοκυττάρων που εκφράζουν τα διαγονίδια	120
5.13.1	Προσδιορισμός της ποιότητας των cDNA βιβλιοθηκών και της RNA-Seq ανάλυσης	126
5.13.2	Συσχέτιση των αποτελεσμάτων της μεταγραφικής ανάλυσης με προηγούμενες αναλύσεις. Ανίχνευση νέων γονιδίων που εκφράζονται σε διακριτές περιοχές του ήπατος	127

5.13.3	Βιοπληροφορική ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων επί των αποτελεσμάτων της μεταγραφικής ανάλυσης	129
5.14	Ιστολογική ανάλυση της έκφρασης των διαγονιδίων σε άλλα όργανα ενήλικων TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακών μυών	131
Κεφάλαιο 6 Σύνοψη Διατριβής		135
Βιβλιογραφία		143
Παραρτήματα		
Παράρτημα I	Διαφορική έκφραση των υπό μελέτη πληθυσμών ηπατοκυττάρων	158
Παράρτημα II	Απεικόνιση των γονιδίων που και στις δυο μελέτες εκφράζονται στις ίδιες περιοχές του ήπατος (ηπατική φλέβα-central region, πυλαία φλέβα-portal region)	184
Παράρτημα III	Απεικόνιση των νέων γονιδίων που ανιχνεύτηκαν να εκφράζονται σε διακριτές περιοχές του ήπατος	186
Δημοσιεύσεις		189

Γενικό Μέρος

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

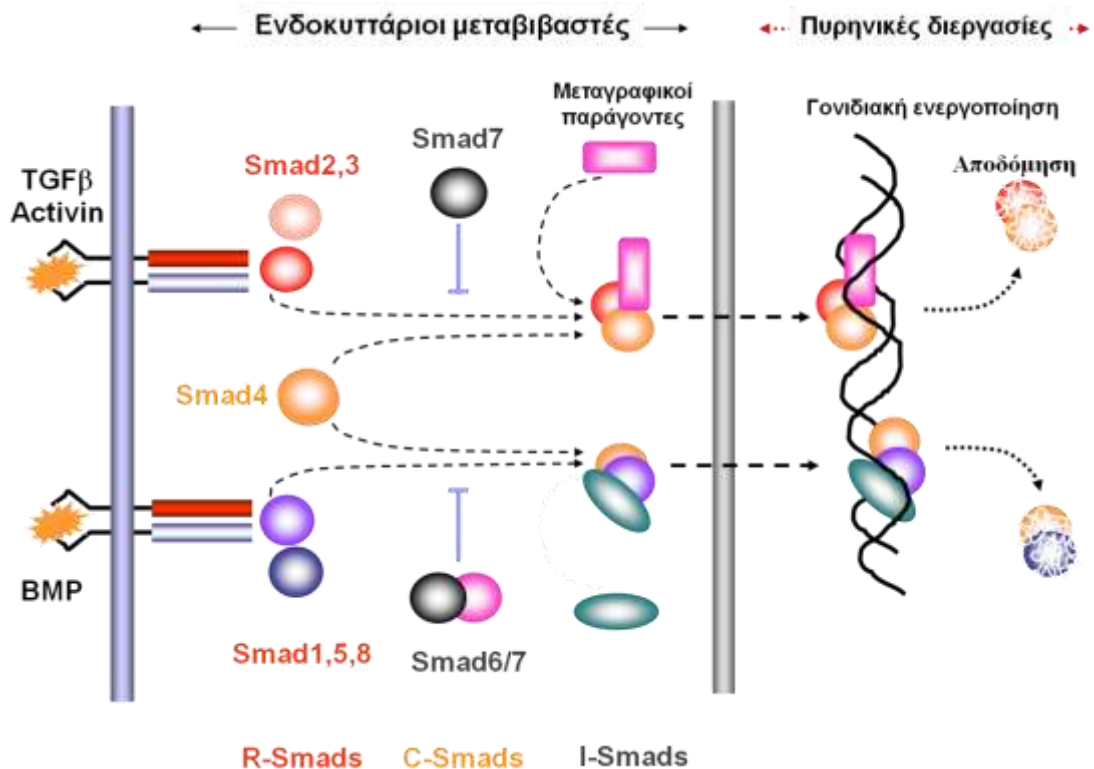
1.1. Η υπερ-οικογένεια αυξητικών παραγόντων μεταμόρφωσης, TGF-β

Η υπερ-οικογένεια του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης-β (TGF-β) περιλαμβάνει κυρίως τους TGF-β1/2/3, τις ακτιβίνες (activins) και τις μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (bone morphogenetic proteins: BMPs) και αποτελεί μια ομάδα κυτταροκινών που παρουσιάζουν πολλαπλή βιολογική δράση σε διάφορα κύτταρα (1, 2). Τα μόρια αυτά ρυθμίζουν την ανάπτυξη (3), αναγέννηση (4), οντογένεση και ομοιόσταση (5) των ιστών σε όλους τους οργανισμούς από το *C. Elegans* (6) και τη Δροσόφιλα (7), μέχρι και τον άνθρωπο (8).

Οι κυτταροκίνες της υπερ-οικογένειας TGF-β επάγουν τη δράση τους μετά από την πρόσδεση σε υποδοχείς (τύπου I και τύπου II) που έχουν δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Αρχικά, τα μόρια αυτά δεσμεύονται στους υποδοχείς τύπου II (οι οποίοι είναι συνεχώς ενεργοποιημένοι) και στη συνέχεια το σύμπλεγμα προσδέτη-τύπου II υποδοχέα συνδέεται με τον υποδοχέα τύπου I. Κατόπιν, ο υποδοχέας τύπου II φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον υποδοχέα τύπου I. Έχουν περιγραφεί επτά [7] τύπου I υποδοχείς και πέντε [5] τύπου II υποδοχείς (9). Οι υποδοχείς τύπου I και II καθώς και οι κυτταροκίνες της υπερ-οικογένειας TGF-β με τις οποίες αυτοί αλληλεπιδρούν συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Διάφοροι τύποι TGF-β υποδοχέων και η ειδικότητα των κυτταροκινών που δεσμεύουν	
Τύπου I υποδοχείς	Κυτταροκίνες
ALK-1 (TSR-1, R3) ALK-2 (ActRi, Tsk7L, R1, SKR1) ALK-3 (BMPRIA, BKR1, TRII) ALK-4 (ActRIB, R2) ALK-5 (TβRI, R4) ALK-6 (BMPRIB, BKR2) ALK-7	TGF-βs, ακτιβίνες TGF-βs, ακτιβίνες, BMP-2/4, BMP-7 BMP-2/4, BMP-7 Ακτιβίνες, Nodal TGF-βs BMP-2/4, BMP-7 Nodal, ακτιβίνες
Τύπου II υποδοχείς	Κυτταροκίνες
TβRII (Τύπου II TGF-β υποδοχέας) ActRIIA (Τύπου II υποδοχέας της ακτιβίνης) ActRIIB (Τύπου II υποδοχέας της ακτιβίνης) BMPRII (Type II BMP receptor) AMHRII	TGF-βs Ακτιβίνες, BMP-7 Ακτιβίνες, BMP-7, BMP-2 BMP-2/4, BMP-7 AMH

Η μετάδοση των μηνυμάτων στο εσωτερικό των κυττάρων γίνεται μέσω των υποδοχέων τύπου I, οι οποίοι φωσφορυλιώνουν ενδοκυττάρους διαβιβαστές, τις πρωτεΐνες Smad-1, -2, -3, -5 και -8. Λόγω της απευθείας ενεργοποίησής τους από τους υποδοχείς τύπου I, οι ανωτέρω Smad πρωτεΐνες ονομάζονται και receptor activated Smads ή «R-Smads». Οι πρωτεΐνες Smad-2 και Smad-3 φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς τύπου I των TGF-βs και των ακτιβινών, ενώ οι Smad-1, Smad-5 και Smad-8 μεταφέρουν ενδοκυττάρια μηνύματα προερχόμενα από τους υποδοχείς τύπου I των BMPs (Εικόνα 1). Οι ενεργοποιημένες μορφές των «R-Smads» σχηματίζουν στο κυτταρόπλασμα ετερομερή πρωτεϊνικά σύμπλοκα με ένα άλλο μέλος της οικογένειας Smad, τον κοινό ρυθμιστή Smad-4 ή «C-Smad». Τα ενεργοποιημένα σύμπλοκα [R-Smads/Smad-4] κατευθύνονται στον πυρήνα όπου συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων-στόχων, με την πρόσδεσή τους σε ειδικές περιοχές του υποκινητή αυτών των γονιδίων (10). Μια ακόμη υποομάδα Smad πρωτεϊνών, τα παρεμποδιστικά Smad-6 και Smad-7 [inhibitory Smads ή I-Smads] ανταγωνίζονται τη δράση των «R-Smads» και δρουν σαν αναστολείς της δράσης των TGF-β κυτταροκινών (11). Το σύστημα μετάδοσης ενδοκυττάρων μηνυμάτων της υπερ-οικογένειας TGF-β αποτυπώνεται σχηματικά στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Σύστημα ενδοκυττάριας σηματοδότησης της οικογένειας κυτταροκινών TGF-β.

Ο καίριος ρόλος των μορίων της οικογένειας του TGF-β κατά την εμβρυογένεση αναδείχθηκε από πειράματα σε γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς, στους οποίους αφαιρέθηκε το υπό μελέτη μόριο και μελετήθηκαν οι επιπτώσεις στην ανάπτυξη του οργανισμού.

Γενετική αποσιώπηση του γονιδίου TGF-β1 σε μύες προκάλεσε ανωμαλίες στην ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου του πλακούντα και στην πρώιμη απόρριψη ενός ποσοστού των εμβρύων, αλλά οι μύες που γεννήθηκαν δεν είχαν άλλες ανατομικές ανωμαλίες εκτός από την ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος που τελικά οδήγησε στο θάνατο, σε ηλικία 3-5 εβδομάδων μετά τη γέννα (12, 13). Ομοίως, η γενετική απαλοιφή των τύπου-I και -II υποδοχέων του TGF-β είχε ως αποτέλεσμα την ημιτελή ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου και της αιμοποίησης του πλακούντα (14, 15). Συγκεκριμένα, η αποσιώπηση της έκφρασης του TβRII προκάλεσε το θάνατο των γενετικά τροποποιημένων μυών κατά την εμβρυϊκή ημέρα 10.5, ενώ η αποσιώπηση του TβRI υποδοχέα προκάλεσε το θάνατο του 50% των γενετικά τροποποιημένων μυών κατά το μέσο της εμβρυϊκής ανάπτυξης, ενώ οι υπόλοιποι μύες πέθαναν σε ηλικία 3-4 εβδομάδων μετά τη γέννα,

προσβεβλημένοι από πολυοργανική φλεγμονή. Η γενετική αποσιώπηση του γονιδίου TGF-β2 σε μύες, προκάλεσε μια σειρά σοβαρών αναπτυξιακών ανωμαλιών σε πλήθος οργάνων, όπως η καρδιά, οι πνεύμονες, τα άκρα, το κρανίο και το πρόσωπο, τα μάτια και ο έσω ους, ο νωτιαίος μυελός, το ουροποιητικό και γεννητικό σύστημα (16), και τελικά το θάνατο κατά τη γέννα. Οι ανωμαλίες οφείλονταν σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, παραγωγή στοιχείων διάμεσης ουσίας και τελικά την ιστική αναδόμηση των οργάνων αυτών. Επιπλέον, η γενετική αποσιώπηση του γονιδίου TGF-β3 σε μύες, οδήγησε σε ημιτελή ανάπτυξη (διάσπαση) της υπερώας του στόματος και τελικά στο θάνατο λίγο μετά τη γέννα, πιθανόν λόγω της αδυναμίας λήψης τροφής και της συνυπάρχουσας βαριάς κρανιακής ανωμαλίας (17, 18).

Όσον αφορά τους BMPs, η εξάλειψη του γονιδίου της BMP2 προκάλεσε ανωμαλίες στο χοριακό και αμνιακό ιστό και στην ανάπτυξη της καρδιάς, με αποτέλεσμα το θάνατο των γενετικά τροποποιημένων μυών κατά την εμβρυϊκή ημέρα 7.5-10.5 (19). Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες BMPs, η BMP3 δεν μπορεί να ενεργοποιήσει τα Smad1/5/8 και να επάγει τη σύνθεση χόνδρου και οστού *in-vivo*. Φαίνεται έτσι να ασκεί αρνητική δράση στον καθορισμό της πυκνότητας των οστών, με αποτέλεσμα η γενετική της αποσιώπηση σε μύες να οδηγεί στην αύξηση της οστικής πυκνότητας στη μετάφυση του μηριαίου οστού (20). Η αδρανοποίηση της BMP4 οδήγησε σε θάνατο των γενετικά τροποποιημένων μυών κατά την εμβρυϊκή ημέρα 7.5-9.5 λόγω ανωμαλιών που παρατηρήθηκαν εξωεμβρυϊκά, αλλά και στο σχηματισμό του οπίσθιου/κοιλιακού μεσοδέρματος (21). Η γενετική αποσιώπηση της BMP5 οδήγησε σε ανωμαλίες στο σχηματισμό του σκελετού, των πνευμόνων, του ήπατος, του ουρητήρα, της ουροδόχου κύστης και του εντέρου, αλλά οι μύες τελικά είναι βιώσιμοι και γόνιμοι (22, 23). Η αδρανοποίηση του γονιδίου της BMP6 δεν προκάλεσε ανωμαλίες στους ιστούς όπου είναι γνωστό ότι εκφράζεται, αλλά διαπιστώθηκε μια μικρή καθυστέρηση στην οστεοποίηση του στέρνου (24). Η γενετική αποσιώπηση του γονιδίου της BMP7 σε μύες, οδήγησε σε πολυδακτυλία των πίσω άκρων και στο θάνατο των περισσότερων μυών εντός είκοσι τεσσάρων ωρών μετά τη γέννα (25). Επίσης, εμφανίστηκαν ανωμαλίες στο μέγεθος του σκελετού και στην ανάπτυξη των οφθαλμών και των νεφρών. Τέλος, η αποσιώπηση του υποδοχέα τύπου-I των BMPs (ALK-3) οδήγησε σε αδυναμία δημιουργίας του μεσοδέρματος κατά την έναρξη της εμβρυογένεσης και τελικά σε απόρριψη των εμβρύων την εμβρυϊκή ημέρα 9.5 (26).

Για να μελετηθεί ο βιολογικός ρόλος των Ακτιβινών κατά την ανάπτυξη, έγινε γενετική αποσιώπηση των γονιδίων της Ινχιμπίνης-βΑ και της Ινχιμπίνης-βΒ σε μύες (27). Η αδρανοποίηση της Ινχιμπίνης-βΑ προκάλεσε σημαντικά προβλήματα στο σχηματισμό του προσώπου, καθώς απουσίαζαν τα μουστάκια της μύτης και οι κάτω κοπτήρες και δε σχηματίστηκε φυσιολογικά η υπερώα στη στοματική κοιλότητα, οδηγώντας τελικά στο θάνατο 24 ώρες μετά τη γέννα. Αντίθετα, η αδρανοποίηση της Ινχιμπίνης-βΒ οδήγησε στην απουσία σχηματισμού των βλεφάρων. Η αποσιώπηση του γονιδίου του υποδοχέα των ακτιβινών ActRIB (ALK4) οδήγησε σε πρόωμη απόρριψη των εμβρύων, λόγω της αδυναμίας μεταγωγής σημάτων που είναι απαραίτητα για τη γαστριδίωση (gastrulation) του εμβρύου και το σχηματισμό του εμβρυϊκού κυλίνδρου (28).

Σε παθολογικές καταστάσεις, οι TFG-βs συντονίζουν φαινόμενα που είναι απαραίτητα για την έναρξη, την εξέλιξη και τον τερματισμό των φλεγμονωδών αντιδράσεων (29-32), αποτελώντας κεντρικούς ρυθμιστές της ανοσιακής απάντησης, κυρίως μέσω του ελέγχου της παραγωγής και λειτουργίας των ρυθμιστικών Τ κυττάρων (33, 34). Η δράση των μελών της οικογένειας του TGF-β, ως αναστολείς του πολλαπλασιασμού από τη μία (35, 36), και ως ρυθμιστές της ανοσιακής απάντησης από την άλλη, εξηγούν τη διττή δράση αυτών των μορίων κατά την εξέλιξη νεοπλασματικών παθήσεων (37-40).

Η οικογένεια των μορίων αυτών περιλαμβάνει μερικούς από τους σημαντικότερους παράγοντες που προκαλούν τη συσσώρευση, στον εξωκυττάριο χώρο, συστατικών όπως το κολλαγόνο, η ινονεκτίνη και προτεογλυκάνες (41-45), ενώ παράλληλα οι κυτταροκίνες αυτές συμμετέχουν στην ομοίωση και την αναδόμηση των ιστών (tissue repair and remodeling), (46, 47). Έτσι, ο TGFβ θεωρείται ότι είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες πρόκλησης ίνωσης στον ιστό (42, 48, 49), όπως αποδείχτηκε από σειρές μελετών σε συστήματα κυτταροκαλλιιεργειών και ζωικών μοντέλων. Το ίδιο ισχύει και για άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας, όπως η Ακτιβίνη Α, για την οποία η επιστημονική μας ομάδα έχει δείξει ότι η υπερέκφρασή της στον πνεύμονα οδηγεί σε παθολογία όμοια με αυτήν της οξείας αναπνευστικής δυσπραγίας στον άνθρωπο (50).

Από το σύνολο των προηγούμενων μελετών είναι εμφανής ο ζωτικός ρόλος των μελών της TGF-β υπερ-οικογένειας κατά την ανάπτυξη και ομοίωση, καθώς και κατά την εμφάνιση και εξέλιξη παθολογικών καταστάσεων. Η πολυπλοκότητα όμως των βιολογικών τους

δράσεων, που εξαρτώνται από την κατάσταση του ιστικού μικροπεριβάλλοντος, την ένταση και έκταση της σηματοδότησης και την απόσταση των κυτταρικών στόχων από την πηγή της σηματοδότησης, δημιούργησε την ανάγκη δημιουργίας νέων εργαλείων προσέγγισης του συγκεκριμένου σηματοδοτικού μονοπατιού.

1.2. Τα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF-β

Η υπερ-οικογένεια του TGF-β αποτελείται από περίπου 40 εκκρινόμενες διμερείς πρωτεΐνες με κοινά δομικά χαρακτηριστικά (51), οι οποίες, ανάλογα με τη δομή τους και τη βιολογική τους δράση, επιμερίζονται στις εξής οικογένειες :

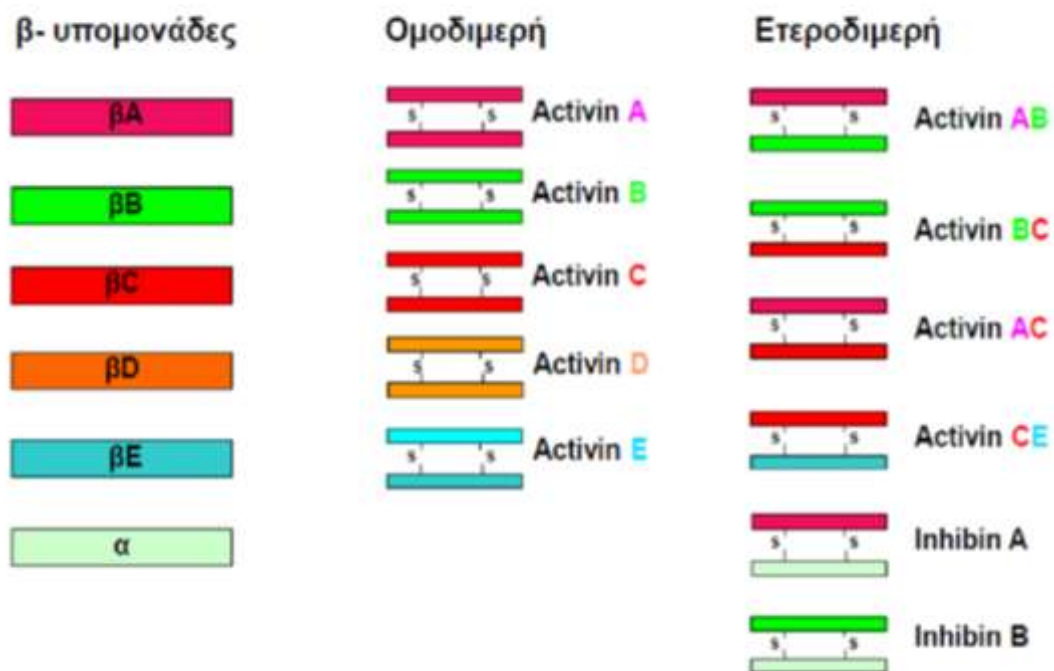
- i) Την οικογένεια των TGF-βs, που περιλαμβάνει τον TGF-β1, την πρωτότυπη και πιο καλά χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη όλης της υπερ-οικογένειας (52), καθώς επίσης και τους TGF-β2 και TGF-β3.
- ii) Την οικογένεια των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών (Bone Morphogenetic proteins, BMPs) που αποτελείται από τις BMP2, 3, 4, 5, 6, 7, 8A, 8B, 9, 10 και 15.
- iii) Την οικογένεια των Ακτιβινών/Ινχιμπινών που αποτελείται από τις Inhibin βA, Inhibin βB, Inhibin βC, Inhibin βE, Inhibin βD, Inhibin βAB, Inhibin βBC, Inhibin βAC, Inhibin βCE, Inhibin A και Inhibin B.
- iv) Την οικογένεια των παραγόντων ανάπτυξης και διαφοροποίησης (Growth and Differentiation Factors, GDFs) που αποτελείται από τους GDF-1, -3, -5, -6, -7, -8 ή μυσστατίνη, -9b, -10, -11 και -15 ή MIC1.
- v) Ένα σύνολο πρωτεϊνών με διττή ή ανασταλτική-έναντι των άλλων μελών τις υπερ-οικογένειας- δράση, όπως οι Nodal, Anti-Müllerian hormone (AMH), LEFTY A, LEFTY B, Follistatin, Gremlin, Chordin κ.τ.λ.

Δομικά, οι πρωτεΐνες της υπερ-οικογένειας έχουν μια χαρακτηριστική τρισδιάστατη αναδίπλωση που χαρακτηρίζεται από την παρουσία μορίων κυστεΐνης στην καρβοξυτελική περιοχή της ώριμης πρωτεΐνης.

Τα μέλη της οικογένειας του TGF-β και οι β πολυπεπτιδικές υπομονάδες των ινχιμπινών, που δημιουργούν τις Ακτιβίνες και Ινχιμπίνες, έχουν εννέα [9] χαρακτηριστικές κυστεΐνες, οχτώ [8] εκ των οποίων δημιουργούν τέσσερις [4] ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς,

ενώ ένας [1] δεσμός ενώνει τις δυο [2] μονομερείς αλυσίδες του ομοδιμερούς ή ετεροδιμερούς συμπλόκου. Οι “α” πολυπεπτιδικές υπομονάδες των ινχιμπινών, οι BMPs και οι GDFs έχουν επτά [7] κυστεΐνες, έξι [6] εκ των οποίων δημιουργούν ενδομοριακούς, και μια [1] υπομονάδα διαμοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι lefty πρωτεΐνες, GDF3, GDF9 και BMP15 έχουν έξι [6] κυστεΐνες, ενώ δεν έχουν κανένα διαμοριακό δισουλφιδικό δεσμό.

Οι Ακτιβίνες σχηματίζονται από δύο [2] όμοιες ή διαφορετικές “β” πολυπεπτιδικές υπομονάδες των ινχιμπινών, που σχηματίζουν αντίστοιχα ομοδιμερή ή ετεροδιμερή, ενώ οι Ινχιμπίνες είναι ετεροδιμερή αποτελούμενα από μια “α” και μια “β” πολυπεπτιδική υπομονάδα των ινχιμπινών (εικόνα 2). Τα άλλα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF-β εμφανίζονται ως ομοδιμερή.



Εικόνα 2: Η οικογένεια των ακτιβινών

Όλα τα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF-β παράγονται ως μια προμορφή, αποτελούμενη στο αμινοτελικό της άκρο από ένα [1] προπεπτίδιο και στο καρβοξυτελικό της άκρο από την ώριμη πρωτεΐνη. Οι δύο υπομονάδες συνδέονται μεταξύ τους με διαμοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς (53). Το προπεπτίδιο των TGF-βs ονομάζεται latency-associated peptide ή LAP και μπορεί όπως και τα προπεπτίδια των άλλων μελών της υπερ-οικογένειας

να αποδεσμευτεί από την ώριμη πρωτεΐνη μετά από πρωτεολυτική λύση των διαμοριακών δεσμών τους. Οι TGF- β s κυκλοφορούν μαζί με το LAP, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη φάση της έκλυσης από το κύτταρο, ενώ αποτελεί και τον κύριο ρυθμιστή της βιοδιαθεσιμότητάς τους, κυρίως μέσω της προσκόλλησής του στην εξωκυττάρια ουσία και αποδέσμευσής του μέσω της δράσης μεταλλοπρωτεασών και άλλων πρωτεϊνών του διάμεσου χώρου, όπως η ινονεκτίνη και η fibrillin 1 (54-56).

Η ικανότητα των προπεπτιδίων να διατηρούν σε ανενεργή μορφή την ώριμη πρωτεΐνη, απαντάται και σε άλλα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF- β , όπως οι GDF8 και GDF11 (57, 58). Παρόλα αυτά, πολλά προπεπτίδια, όπως αυτά των BMP4, BMP7 και nodal, δεν ασκούν αδρανοποιητική δράση στην ώριμη πρωτεΐνη, αλλά ελέγχουν τη σταθερότητα και αποικοδόμησή τους, ρυθμίζοντας έτσι τη διαθεσιμότητά τους (59-61).

1.3. Διαμεμβρανικοί υποδοχείς των κυτταροκινών της TGF- β υπερ-οικογένειας

Όπως αναφέρθηκε ήδη, τα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF- β αναγνωρίζονται από το κύτταρο μέσω ενός συμπλέγματος τύπου-I και τύπου-II υποδοχέων (Πίνακας 1). Οι υποδοχείς αυτοί έχουν έντονη δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης και ασθενέστερη δράση κινάσης τυροσίνης. Οι προσδέτες συνδέονται αρχικά ως διμερή με τον (συνεχώς ενεργοποιημένο) τύπου-II υποδοχέα και αυτός με τη σειρά του προσελκύει στο ετεροδιμερές σύμπλεγμα, τον τύπου-I υποδοχέα, φωσφορυλιώνοντας τον στο ενδομεμβρανικό τμήμα της ενδοκυττάριας GS-επικράτειάς του, ενεργοποιώντας τη δράση κινάσης της συγκεκριμένης περιοχής. Η ενεργοποίηση αυτή είναι αναγκαία και ικανή για την ενδοκυττάρια μεταβίβαση της σηματοδότησης (62). Ιστορικά, έχει επικρατήσει οι τύπου-I υποδοχείς να ονομάζονται και ALKs (Activin receptor-like kinases), εξυπηρετώντας έτσι την ανάγκη της αντιστοίχισης πολλών προσδετών σε έναν υποδοχέα και πολλών υποδοχέων σε έναν προσδέτη. Οι υποδοχείς τύπου-I εμφανίζουν παρόμοια δομή με αυτήν των υποδοχέων τύπου-II, καθώς φέρουν μία εξωκυττάρια περιοχή που περιέχει την επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια επικράτεια με δράση κινάσης. Μοναδικό χαρακτηριστικό των υποδοχέων τύπου-I είναι η παρουσία ενός τμήματος ~30 αμινοξικών καταλοίπων, πλούσιο σε σερίνη, θρεονίνη και γλυκίνη, το οποίο βρίσκεται μεταξύ της διαμεμβρανικής περιοχής και της επικράτειας

κινάσης. Το τμήμα αυτό περιέχει μια χαρακτηριστική ακολουθία SGSGSG και για αυτό το λόγο χαρακτηρίζεται ως GS επικράτεια. Η GS επικράτεια είναι παρούσα σε όλους τους υποδοχείς τύπου-I των μελών της υπερ-οικογένειας TGF-β και αποτελεί τη θέση φωσφορυλίωσης του υποδοχέα τύπου-I από τους υποδοχείς τύπου-II. Η φωσφορυλίωση της περιοχής της GS επικράτειας, οδηγεί στην απελευθέρωση του ενεργού κέντρου πρόσδεσης του ATP, ενεργοποιώντας έτσι τη δράση κινάσης του υποδοχέα τύπου-I (63).

Στα περισσότερα κύτταρα, οι TGF-βs σηματοδοτούν μέσω ενός συμπλέγματος που αποτελείται από δύο [2] ALK-5 (TβRI) υποδοχείς και δύο [2] TβRII υποδοχείς. Σε ορισμένους όμως κυτταρικούς τύπους, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οι TGF-βs μπορούν να σηματοδοτήσουν και μέσω άλλων τύπου-I υποδοχέων, όπως ο ALK1, με ανταγωνιστική έναντι του ALK5, δράση (64, 65). Η συμμετοχή και άλλων τύπου-I υποδοχέων, όπως ο ALK2, στη σηματοδότηση μέσω των TGF-βs ακόμα ελέγχεται (66).

Το σύμπλεγμα των ενεργοποιημένων τύπου-I και -II υποδοχέων μπορεί να ενδοκυτταρωθεί μέσω δύο μονοπατιών, για δύο διαφορετικούς σκοπούς: η ενδοκυττάρωση μέσω κυστιδίων κλαθρίνης οδηγεί τους υποδοχείς στα πρώιμα ενδοσώματα, απ' όπου μπορεί να ξεκινήσει η μεταγωγή σήματος, ενώ η ενδοκυττάρωση σε κυστίδια θετικά στην καβεολίνη, συμβάλει στην αποικοδόμηση των υποδοχέων (67, 68). Η ύπαρξη δύο μονοπατιών ενδοκυττάρωσης δημιουργεί μια δυναμική ισορροπία ανάμεσα στην ενδοκυττάρια κυκλοφορία των υποδοχέων, την κατανομή τους στα κυτταρικά διαμερίσματα και τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Η παρεμπόδιση ενός από τα δύο μονοπάτια ενδοκυττάρωσης των υποδοχέων καθοδηγεί τους υποδοχείς προς το άλλο μονοπάτι.

Επιπλέον, η σηματοδότηση των μορίων της TGF-β υπερ-οικογένειας μπορεί να ρυθμιστεί και μέσω των συν-υποδοχέων τύπου-III, που σε συνδυασμό με τους υποδοχείς τύπου-I και -II ή και τελείως ανεξάρτητα, οδηγούν σε ενίσχυση ή αποσιώπηση της ενδοκυττάριας σηματοδότησης. Έτσι, οι TGF-βs μπορεί να αλληλεπιδράσουν με τους συν-υποδοχείς endoglin και betaglycan [τύπου-III TGF-β υποδοχείς]. Για παράδειγμα, σε αντίθεση με τους παράγοντες TGF-β1 και TGF-β3 που προσδέονται ισχυρά με τον TβRII υποδοχέα, η πρόσδεση του TGF-β2 είναι πολύ ασθενής και ενισχύεται, οδηγώντας σε σηματοδότηση, μόνο υπό την παρουσία του betaglycan (69). Ο υποδοχέας betaglycan μπορεί επίσης να προσδεθεί και να τροποποιήσει την ενεργότητα των TGF-β1, TGF-β3, Activin-A, BMP2,

BMP4, BMP7 και GDF5 (70). Σε αντίθεση με τον betaglycan, ο συν-υποδοχέας endoglin εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, στα οποία υποεκφράζεται ή δεν εκφράζεται καθόλου ο betaglycan. Ο Endoglin ενισχύει την TGF-β1-, BMP7- και BMP9-επαγόμενη Smad1/Smad5 ενεργοποίηση, ενώ αναστέλλει την TGF-β/Smad3 ενεργοποίηση (71). Με παρόμοιο τρόπο, η σηματοδότηση μέσω των BMPs μπορεί να τροποποιηθεί μέσω των τύπου-III υποδοχέων RGMa,b,c (Repulsive Guidance Molecule ή Dragon), των GDFs μέσω του cripto3 και των Ακτιβινών μέσω των crypto 1 και 3 (72).

1.4. Ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω των Smads

Η ενεργοποίηση των διαμεμβρανικών υποδοχέων της υπερ-οικογένειας του TGF-β έχει ως αποτέλεσμα την επακόλουθη μεταγωγή του σήματος μέσω των ενδοκυττάρων διαβιβαστών έως τον πυρήνα, οδηγώντας στην έκφραση των επαγόμενων γονιδίων. Οι ενδοκυττάριοι διαβιβαστές διακρίνονται στους Smads, που διαμεσολαβούν στο «κανονικό» σηματοδοτικό μονοπάτι της υπερ-οικογένειας (73), ενώ άλλες πρωτεΐνες όπως οι κινάσες Mark, Erk, JNK, p38, RhoA, Akt και άλλες (74), διαμεσολαβούν στα «μη κανονικά ή εναλλακτικά» σηματοδοτικά μονοπάτια.

Η σηματοδότηση μέσω Smad μεταδίδει άμεσα τα σήματα από τους υποδοχείς της υπερ-οικογένειας TGF-β στον πυρήνα, ρυθμίζοντας την έκφραση πλήθους γονιδίων ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και το κυτταρικό περιβάλλον. Με άλλα λόγια, το μονοπάτι μεταγωγής σήματος TGF-β/Smad ερμηνεύει με ακρίβεια τις εξωκυττάρια συγκεντρώσεις των μελών της υπερ-οικογένειας TGF-β και τις μεταφράζει στην κατάλληλη έκφραση των γονιδίων στόχων, στον κατάλληλο χρόνο και στη σωστή θέση.

Το πρώτο μέλος της οικογένειας των Smad μορίων ανακαλύφθηκε στην *Drosophila melanogaster* μετά από γενετικό έλεγχο και ονομάστηκε Mad (mother against dpp) (75). Μία παρόμοια πρωτεΐνη αναγνωρίστηκε στον *Caenorhabditis elegans* και αναφέρεται ως Sma (6). Στη συνέχεια, ομόλογες πρωτεΐνες των Mad και Sma βρέθηκαν σε ποικίλα σπονδυλωτά και ονομάστηκαν Smad από την σύζευξη των “Sma” και “Mad”.

Υπάρχουν οκτώ διακριτές πρωτεΐνες Smads που χωρίζονται σε τρεις λειτουργικές ομάδες: Οι “από τον υποδοχέα ρυθμιζόμενοι” R-Smads (receptor-regulated Smads-Smad1,2,3,5,8), ο

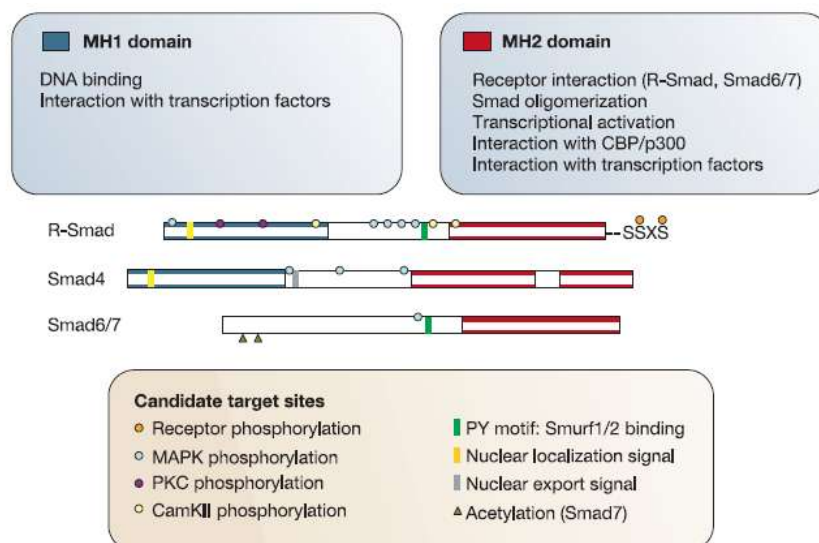
“κοινός” Smad (Co-Smad ή Co-mediator Smad- Smad4) και οι “παρεμποδιστικοί” Smads (I-Smads-inhibitory Smads-Smad6,7). Ο R-Smad2 και ο R-Smad3 φωσφορυλιώνονται από υποδοχείς τύπου-I που ενεργοποιούνται από τον TGF-β και τις Ακτιβίνες, ενώ ο R-Smad1, ο R-Smad5 και ο R-Smad8 ενεργοποιούνται από υποδοχείς τύπου-I που αντιστοιχούν στους BMPs. Αντίθετα, ο Smad4, ο οποίος αρχικά απομονώθηκε ως προϊόν του ογκοειδικού γονιδίου καταστολής DPC4 (deleted in pancreatic carcinoma, locus 4) (76), είναι ο μόνος Co-Smad στα θηλαστικά. Οι I-Smads (Smad6 and 7) λειτουργούν ως αναστολείς της δράσης των R-Smads. Σε κανονικές συνθήκες, οι R-Smads βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ ο Smad4 κατανέμεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Μετά τη διέγερση από τα μέλη της υπερ-οικογένειας TGF-β, τόσο οι R-Smads όσο και ο Smad4 συγκεντρώνονται στον πυρήνα. Η παλίνδρομη μετακίνηση και ο συνεχής έλεγχος της κατάστασης ενεργοποίησης των υποδοχέων είναι βασικοί παράμετροι για τη βιολογική λειτουργία όλων των μελών του μονοπατιού μεταγωγής σήματος Smad (77). Τα πυρηνικά σήματα εισόδου και τα πυρηνικά σήματα εξόδου των Smads μεσολαβούν στη συνεχή πυρηνο-κυτταροπλασματική παλίνδρομη μετακίνηση, απουσία κυτταρικής διέγερσης. Όμως, μετά τη φωσφορυλίωση των R-Smads από τους ενεργοποιημένους υποδοχείς, οι αλλαγές στη δομή των R-Smads και του Smad4 μεταβάλλουν την ισορροπία των πυρηνικών σημάτων εισόδου και εξόδου. Έτσι, η δραστηριότητα των πυρηνικών σημάτων εισόδου αυξάνεται και των σημάτων εξόδου μειώνεται, με αποτέλεσμα τη συγκέντρωση του συμπλόκου των Smads στον πυρήνα. Όταν παύσει η μεταγωγή σήματος, τα Smads επιστρέφουν γρήγορα στο κυτταρόπλασμα, οδηγώντας στη λήξη της μεταγραφής μόλις σταματήσει η διέγερση των υποδοχέων. Επειδή διαφορετικές συγκεντρώσεις των μελών της υπερ-οικογένειας TGF-β έχουν διαφορετική επίδραση στη μεταγραφή, η παλίνδρομη μετακίνηση είναι σημαντική διότι επιτρέπει το χρονικά δυναμικό έλεγχο του ποσού των συμπλόκων Smads που θα βρίσκονται στον πυρήνα.

Δομικά, οι R-Smads και Co-Smads έχουν δύο [2] υψηλά συντηρημένες περιοχές, τις MH1 και MH2 επικράτειες, που βρίσκονται στο αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο των μορίων αντίστοιχα και συνδέονται με μια λιγότερο συντηρημένη περιοχή-σύνδεσμο (Εικόνα 2). Η MH1 επικράτεια των I-Smads είναι πολύ πιο κοντή σε σύγκριση με εκείνη των R-Smads και Smad4. Τα R-Smads έχουν μια χαρακτηριστική θέση φωσφορυλίωσης, ένα Ser-Ser-X-Ser μοτίβο, στο καρβοξυτελικό άκρο. Η ειδική αλληλεπίδραση των υποδοχέων με τα Smads

καθορίζεται κυρίως από χαρακτηριστικά δομικά μοτίβα που υπάρχουν στους υποδοχείς τύπου-I και τα R-Smads, όπως είναι ο L45 βρόγχος στην περιοχή της επικράτειας κινάσης στους υποδοχείς τύπου-I και ο L3 βρόγχος στην MH2 επικράτεια των R-Smads (78). Η αμινοξική ακολουθία που σχηματίζει τον L45 βρόγχο είναι συντηρημένη μεταξύ των υποδοχέων τύπου-I με παρόμοια ειδικότητα υποστρώματος, όπως είναι ο ALK4 και ο ALK5, που έχουν όμοια ακολουθία στον L45 βρόγχο και η οποία διαφέρει από εκείνη των υποδοχέων τύπου-I των BMPs. Παρομοίως, και τα Smad2 και Smad3, υποστρώματα των ALK4 και ALK5 αντίστοιχα, χαρακτηρίζονται από όμοια ακολουθία στον L3 βρόγχο, που διαφέρει από εκείνη των Smad1, 5, και Smad8 (79).

Η MH1 επικράτεια του Smad3 μπορεί να συνδέεται άμεσα στο DNA, ενώ η MH1 επικράτεια του Smad2 δεν μπορεί. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας μιας ένθεσης 30 αμινοξικών καταλοίπων στην MH1 επικράτεια του Smad2 ως προϊόν εναλλακτικού ματίσματος, η οποία αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωση της επικράτειας και εμποδίζει την απευθείας σύνδεση του Smad2 στο DNA (80). Η MH1 επικράτεια του Smad4 μπορεί επίσης να συνδεθεί με το DNA.

Η MH2 επικράτεια των Smad2, Smad3, Smad4, και Smad7 είναι κυρίως υπεύθυνη για τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν μέσω αυτών των περιοχών περιλαμβάνουν και τα ίδια τα Smads που σχηματίζουν ομο- ή ετερο-ολιγομερή, όπως και πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες. Αυτή η επικράτεια περιλαμβάνει επίσης τη θέση φωσφορυλίωσης από τον τύπου-I υποδοχέα και μία θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης SARA (Smad anchor for receptor activation), η οποία μεσολαβεί στη σύνδεση των Smad2 και 3 με τους υποδοχείς ακτιβίνης και TGF-β.



Εικόνα 3: Η δομή και ο ρόλος των επικρατειών των Smads, στις οποίες επισημαίνονται οι θέσεις στόχευσης τροποποιητικών μορίων και συνοδών κινασών (προσαρμοσμένο από τους Rik Derynck & Ying E. Zhang, 2003).

Η περιοχή σύνδεσης μεταξύ της MH1 και MH2 επικράτειας, αν και δεν είναι υψηλά συντηρημένη, εμπλέκεται σε σημαντικές διεργασίες. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει θέσεις φωσφορυλίωσης για τις κινάσες MAPK (Mitogen-activated protein kinases), ERK (extracellular signal-regulated kinase), CDK (cyclin-dependent kinase) και τις Ca^{2+} -εξαρτώμενες κινάσες τύπου II (81, 82). Η φωσφορυλίωση της περιοχής αυτής επηρεάζει αρνητικά την ενεργότητα των Smads, γιατί έχει ως αποτέλεσμα οι Smad πρωτεΐνες να μην μπορούν να μετακινηθούν στον πυρήνα.

Απουσία ενεργοποίησης από τον υποδοχέα, οι MH1 και η MH2 επικράτειες των Smads είναι ενωμένες η μία με την άλλη και τα R-Smads είναι αγκυροβολημένα ως διμερή στην πλασματική μεμβράνη, μέσω της SARA πρωτεΐνης και άλλων μορίων (83). Η φωσφορυλίωση του καρβοξυτελικού άκρου των R-Smads από τους υποδοχείς τύπου-I έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της αλληλεπίδρασης μεταξύ των MH1 και MH2 επικρατειών και το σχηματισμό ετερο-ολιγομερών των R-Smads με το Co-Smad μέσω της MH2 επικράτειας. Αυτά τα ετερο-ολιγομερή συμπλέγματα των Smads, R-Smad-Co-Smad, μεταφέρονται στον πυρήνα όπου και αλληλεπιδρούν με το DNA, ρυθμίζοντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων.

Αν και το σύμπλεγμα των R-Smad-Co-Smad μπορεί να συνδέεται άμεσα στο DNA, η συγγένεια και η ειδικότητα σύνδεσης είναι χαμηλή. Γι αυτό και είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τα Smads, η παρουσία και άλλων πρωτεϊνικών μορίων, που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες και μπορούν να ενισχύσουν και να εξειδικεύσουν την ικανότητα πρόσδεσης των Smads στο DNA. Τέτοιοι παράγοντες είναι για παράδειγμα ο FAST (Forkhead Activin Signal Transducer) (84), οι Fos και Jun και ο υποδοχέας της βιταμίνης D. Στη συνέχεια, τα Smads μπορούν να αλληλεπιδράσουν και με άλλους μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές ή/και συν-καταστολείς, επάγοντας τη θετική ή την αρνητική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, στο καρβοξυτελικό άκρο τους μπορεί να συνδεθεί ο συν-ενεργοποιητής της μεταγραφής CBP (CREB-binding protein) ή p300, ο οποίος προκαλεί την ακετυλίωση των ιστονών και τη

χαλάρωση της οργάνωσης των νουκλεοσωμάτων. Έτσι, αυξάνεται η προσβασιμότητα της βασικής μεταγραφικής μηχανής για τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Αντίθετα, η αλληλεπίδραση των Smads με συν-καταστολείς της μεταγραφής, οδηγεί στη συμπίκνωση της δομικής οργάνωσης και κατανομής των νουκλεοσωμάτων, μέσω εκλεκτικής υποακετυλίωσης των ιστονών τους.

Αρκετοί μεταγραφικοί συν-καταστολείς αλληλεπιδρούν με τα Smads. Η πρωτεΐνη TGIF (TG-interacting factor) είναι ο πρώτος μεταγραφικός συνκαταστολέας που έχει δειχθεί να αλληλεπιδρά με τα Smads (85). Οι πρωτεΐνες C-Ski και SnoN (Ski-related novel gene) είναι επίσης μεταγραφικοί συν-καταστολείς που συνδέονται με τα Smad2, 3 και 4. Οι TGIF και C-Ski ενεργοποιούν την απακετυλάση των ιστονών (HDACs), η οποία οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων και με αυτόν τον τρόπο ανταγωνίζονται με τον p300/CBP για την αλληλεπίδραση με τα R-smads (86).

Η προσθήκη μορίων ουβικουΐτινης και η επακόλουθη αποικοδόμηση των ενεργοποιημένων R-Smads οδηγούν στον τερματισμό της μεταγωγής σήματος μέσω Smads. Οι Smurf1 και 2 πρωτεΐνες συμμετέχουν στην προσθήκη μορίων ουβικουΐτινης στους ενεργοποιημένους υποδοχείς της υπερ-οικογένειας του TGF-β, με συνέπεια την αποικοδόμησή τους στο πρωτεάσωμα. Τα I-Smad Smad6 και Smad7, παίζουν σημαντικό ρόλο στη διεργασία αυτή, μιας και σε κατάσταση ηρεμίας βρίσκονται στον πυρήνα, ενώ μετά την ενεργοποίηση του κυττάρου μετακινούνται στην πλασματική μεμβράνη. Οι Smurf1 και Smurf2 σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με το Smad6-7 και καθοδηγούν το σύμπλοκο Smurf-I-Smad στην πλασματική μεμβράνη, όπου τα I-Smads συνδέονται άμεσα στον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I και παρεμποδίζουν τη φωσφορυλίωση των R-Smads. Η Smurf1, που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη, συμβάλλει άμεσα στην προσθήκη μορίων ουβικουΐτινης στους υποδοχείς και συμμετέχει στην ανακύκλωσή τους. Παρομοίως, μόρια ουβικουΐτινης προστίθενται στα I-Smads με συνέπεια την αποικοδόμησή τους. Και άλλοι όμως τύποι εξωκυττάρων συνδετών μπορούν επίσης να διεγείρουν τη σύνθεση παρεμποδιστικών Smads, ανταγωνιζόμενοι το σήμα από τα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF-β. Η ιντερφερόνη-γ, π.χ., ενεργοποιεί το μονοπάτι μεταγωγής σήματος Jak-STAT και τα ενεργοποιημένα διμερή STATs που δημιουργούνται επάγουν τη σύνθεση I-Smads. Έτσι, η ροή σήματος μέσω του μονοπατιού των TGF-βs συνεχώς ενισχύεται, καταστέλλεται ή τροποποιείται από άλλα σήματα που δέχεται το κύτταρο. Έχουν αναφερθεί επίσης άμεσες

επιπτώσεις της ενεργοποίησης των μονοπατιών Ras, STAT και NF-κB επί των Smads ή κάποιων από τους παράγοντες που επηρεάζουν άμεσα τους Smads.

1.5. Ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω εναλλακτικών (μη Smad) μονοπατιών

Αν και οι Smad πρωτεΐνες αποτελούν τους κύριους μεταγωγείς σήματος στο σηματοδοτικό μονοπάτι της υπερ-οικογένειας του TGF-β, μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να ασκηθούν ορισμένες από τις βιολογικές τους λειτουργίες μέσω μονοπατιών σηματοδότησης στα οποία δε συμμετέχουν τα Smad μόρια, όπως μέσω ενεργοποίησης των κινασών p38 MAPK (Mitogen-activated protein kinase), ERK και JNK (c-Jun N-terminal kinase) (74).

Συγκεκριμένα, από τους ενεργοποιημένους υποδοχείς τύπου-II και -I ξεκινάει ένας καταρράκτης φωσφορυλιώσεων που οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Ras, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την κυτταροπλασματική κινάση σερίνης/θρεονίνης Raf-1, το πρώτο μέλος της οικογένειας των κινασών, που μεταφέρουν το βιολογικό σήμα από την κυτταρική μεμβράνη στον πυρήνα. Η ενεργοποιημένη κινάση Raf-1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μέλη της πρωτεϊνικής οικογένειας των κινασών MAPKK/MEK (mitogen activated protein kinase kinase), με χαρακτηριστικότερους αντιπροσώπους τις πρωτεΐνες MEK (MAP kinase kinase). Ένα από τα κυριότερα πρωτεϊνικά υποστρώματα των MEK κινασών αποτελούν τα μέλη της οικογένειας των MAPK/ERK κινασών, οι οποίες στη συνέχεια μετακινούνται στον πυρήνα, ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων.

1.6. Ο ρόλος της υπερ-οικογένειας του TGF-β στην ανάπτυξη και την παθοφυσιολογία του πνεύμονα

Σε όργανα όπως ο πνεύμονας, τα μόρια της υπερ-οικογένειας του TGF-β αποτελούν σημαντικούς παράγοντες διαμόρφωσης της ανάπτυξης και παθοφυσιολογίας αυτού των οργάνου.

Και οι τρεις μορφές του TGF-β εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα κατά την ανάπτυξη του πνεύμονα των μυών. Ο TGF-β1 εκφράζεται από την ενδέκατη [11] εμβρυϊκή ημέρα στο κυτόπλασμα των κυττάρων του στρώματος και των επιθηλιακών κυττάρων του αρχέγονου

πνευμονικού ιστού, και η έκφρασή του αυξάνεται την εμβρυϊκή ημέρα 14-15, όταν σχηματίζεται ο βρογχικός και κυψελιδικός πόρος (87). Μετάγραφα του TGF-β2 ανιχνεύτηκαν αποκλειστικά στο ενδοδερμικό βρογχικό επιθήλιο κατά τα τελικά στάδια της ανάπτυξης του πνεύμονα (88), ενώ ο TGF-β3 εκφράζεται κατά τις ημέρες 12.5-15.5 της εμβρυϊκής ανάπτυξης του πνεύμονα (88). Τα μετάγραφα ανιχνεύτηκαν καταρχήν στο μεσέγγυμα της τραχείας και κατόπιν στα επιθηλιακά κύτταρα του ενδοδέρματος, στους προγόνους των αναπτυσσόμενων βρογχιολίων. Στο εγγύς τμήμα του πνεύμονα, ο TGF-β φαίνεται να είναι ο κύριος παράγοντας διαφοροποίησης του πλακώδους βρογχικού επιθηλίου (89), ενώ στο απομακρυσμένο τμήμα του πνεύμονα, ο TGF-β φαίνεται να ελέγχει την ανάπτυξη των τύπου-II πνευμονοκυττάρων (90). Μελέτες με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων μυών αποκάλυψαν τη σημασία του TGF-β στην ανάπτυξη του πνευμονικού επιθηλίου. Αποσιώπηση της έκφρασης του ALK5 υποδοχέα στο πνευμονικό επιθήλιο οδήγησε σε αναστολή της διαφοροποίησης των κυττάρων Clara του βρογχικού επιθηλίου (91), ενώ η αποσιώπηση της έκφρασης του τύπου-II υποδοχέα του TGF-β στα πνευμονοκύτταρα τύπου-II οδήγησε σε αναστολή της κυψελιδοποίησης και της διαφοροποίησης των τύπου-I πνευμονοκυττάρων (92). Αναστολή της έκφρασης του TGF-β2 οδήγησε σε θάνατο από πνευμονική ανεπάρκεια κατά τη γέννηση, χωρίς όμως εμφανείς ανατομικές ανωμαλίες (16), ενώ η αποσιώπηση του TGF-β3 οδήγησε σε μη βιώσιμο φαινότυπο που χαρακτηρίστηκε από αναπτυξιακή καθυστέρηση, κυψελιδική υποπλασία και αναστολή της έκφρασης της σουρφακτάνης-C (93).

Από τους BMPs, αυτός που έχει μελετηθεί καλύτερα στον πνεύμονα είναι ο BMP4. Ο BMP4 παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα των απομακρυσμένων επιθηλιακών προβολών ως αποτέλεσμα της παραγωγής FGF10 από το μεσέγγυμα (94-96). Ο BMP4 εκφράζεται επίσης και από τα περιβρογχικά λεία μυϊκά κύτταρα (97). Παρόλο που δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο ρόλος του, έχει προταθεί η συμμετοχή του στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων και στη ρύθμιση του εγγύς-απομακρυσμένου προτύπου του πνευμονικού επιθηλίου, ενώ παράλληλα θεωρείται ότι ελέγχει τη διακλάδωση του βρογχικού δέντρου μέσω της διαφοροποίησης των περιβρογχικών λείων μυϊκών κυττάρων (96, 97). Από τους υπόλοιπους BMPs, ο BMP7 εκφράζεται κυρίως στο ενδόδερμα κατά τις εμβρυϊκές ημέρες 11.5-13.5, αλλά τα επίπεδά του μειώνονται στο επιθήλιο και το μεσέγγυμα έως την εμβρυϊκή ημέρα 15 (98-100). Ο BMP5 εκφράζεται στο μεσέγγυμα από

την εμβρυϊκή ημέρα 10.5 τουλάχιστον μέχρι την εμβρυϊκή ημέρα 16.5 (97), ενώ ο BMP3 εκφράζεται στο βρογχικό επιθήλιο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (100). Με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων μυών επιβεβαιώθηκε η σημασία των BMPs στην ανάπτυξη του πνεύμονα. Γενετική αποσιώπηση του BMP4 στα τύπου-II πνευμονοκύτταρα προκάλεσε υποπλασία του πνεύμονα, δημιουργία διευρυμένων κενών στην περιφέρεια που παρεμπόδισαν το φυσιολογικό σχηματισμό των κυψελίδων, περιορισμένο πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, μικρή αλλά σημαντική αύξηση του πολλαπλασιασμού των μεσεγχυματικών κυττάρων, συνοδευόμενη από αύξηση του ποσοστού της απόπτωσης και τέλος, περιορισμό της διαφοροποίησης των τύπου-II πνευμονοκυττάρων (99). Η υπερέκφραση του αναστολέα των BMPs Noggin, προκάλεσε επίσης ανωμαλία στην ανάπτυξη του πνεύμονα (101). Η γενετική αποσιώπηση της έκφρασης του υποδοχέα ALK3 (102, 103) ή του Smad1 (104) στα τύπου-II πνευμονοκύτταρα, οδήγησε σε μη φυσιολογική ανάπτυξη των κυψελίδων, η οποία χαρακτηρίστηκε από μειωμένο πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, αλλά και ανωμαλίες στο μηχανισμό διαφοροποίησης και ωρίμανσής τους. Τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν τον αυστηρό έλεγχο που απαιτείται στη ρύθμιση της σηματοδότησης των BMPs για τη φυσιολογική ανάπτυξη του οργάνου.

Επιπρόσθετα, τα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF-β έχουν εμπλακεί σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων του πνεύμονα. Ο TGF-β είναι ο κύριος παράγοντας που εμπλέκεται στην ίνωση του οργάνου και τα επίπεδά του αυξάνονται σε ασθενείς σε διάμεση πνευμονική ίνωση, ενώ σε ζωικά μοντέλα, η υπερέκφρασή του οδηγεί σε ίνωση (105, 106) και η αναστολή του αναστρέφει το φαινότυπο (107, 108). Η γενετική αποσιώπηση της έκφρασης του Smad3 (109), καθώς και η αποσιώπηση της έκφρασης του τύπου-II υποδοχέα του TGF-β στο πνευμονικό επιθήλιο (110), οδήγησαν σε μερική αναστολή της ίνωσης στο μοντέλο της μπλεομυκίνης. Μεταξύ των παραγόντων που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση του TGF-β, η ανβ6 ιντεγκρίνη που παράγεται κυρίως από τα επιθηλιακά κύτταρα, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο (111, 112), ενώ η γενετική της αποσιώπηση οδηγεί σε μερική αναστολή της ίνωσης μέσω της αναστολής της ενεργοποίησης του TGF-β (113, 114). Ο TGF-β ενεργοποιεί επίσης την έκφραση και άλλων ινωτικών παραγόντων όπως ο CTGF (connective tissue growth factor) (115) και εμπλέκεται στη μεταμόρφωση των επιθηλιακών κυττάρων σε ινοβλάστες (EMT, Epithelial-

Mesenchymal Transition) (116), κυρίως δρώντας πάνω στα τύπου-II πνευμονοκύτταρα (117, 118). Η υπερέκφραση της Ακτιβίνης-Α στον πνεύμονα πειραματόζων, οδήγησε σε βαριά παθολογία, αντίστοιχη με αυτήν που απαντάται στην οξεία αναπνευστική δυσπραγία στον άνθρωπο (50). Από την άλλη, η αναστολή της σηματοδότησης μέσω των BMPs μετά από πειραματική υπερέκφραση στον πνεύμονα του αναστολέα αυτών, Gremlin, οδήγησε σε αναστρέψιμη ίνωση (119, 120), υποδεικνύοντας ότι η πνευμονική βλάβη μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα της διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ της δράσεως μέσω TGF-β/Ακτιβινών και BMPs.

Σαφής είναι και η συσχέτιση των BMPs με την εμφάνιση πνευμονικής υπέρτασης. Μεταλλάξεις του τύπου-II υποδοχέα των BMPs σχετίζονται με την εμφάνιση οικογενούς πρωτοπαθούς (121) και σποραδικής (122) πνευμονικής υπέρτασης στον άνθρωπο, ενώ σε ζωικά μοντέλα, η μερική αναστολή της έκφρασης του τύπου-II υποδοχέα των BMPs, οδηγεί σε αύξηση της ευαισθησίας στην εμφάνιση φλεγμονής, βλάβης του ενδοθηλίου και πνευμονικής υπέρτασης, ως αποτέλεσμα της πάχυνσης των τοιχωμάτων των πνευμονικών αγγείων (123, 124).

Ο ρόλος των μελών της TGF-β υπερ-οικογένειας έχει μελετηθεί και σε φλεγμονώδεις παθολογικές καταστάσεις του πνεύμονα, όπως το άσθμα (125). Πολυμορφισμοί του γονιδίου του TGF-β έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση άσθματος (126) και τη βαρύτητα της νόσου (127). Η κυτταροκίνη IL-13, μια από τις χαρακτηριστικές ιντερλευκίνες που υπερεκφράζονται στο άσθμα, οδηγεί στην υπερέκφραση του TGF-β (128) και μπορεί να οδηγήσει στην ίνωση που παρατηρείται στους χρόνιους ασθματικούς ασθενείς και τα ζωικά μοντέλα, αντίστοιχα (129). Ο TGF-β είναι γνωστό ότι επάγει την παραγωγή των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων (130), τα οποία με τη σειρά τους παράγουν IL-10 και TGF-β και καταστέλλουν τις Th2 ανοσοαποκρίσεις, περιορίζοντας την αλλεργική φλεγμονή (131). Η κυτταροκίνη IL-13 επάγει και την παραγωγή Ακτιβίνης-Α στο άσθμα (132), ο ρόλος της οποίας στην εξέλιξη της νόσου δεν είναι ξεκάθαρος. Πειραματική υπερέκφραση του αναστολέα της Ακτιβίνης, Φολλιστατίνη, οδήγησε σε βελτίωση των κλινικών χαρακτηριστικών της νόσου (133), ενώ αντίθετα, η συστηματική χορήγηση Ακτιβίνης-Α σε ζωικά μοντέλα άσθματος οδήγησε στο ίδιο αποτέλεσμα (134).

1.7. Ο ρόλος της υπερ-οικογένειας του TGF-β στην ανάπτυξη και την παθοφυσιολογία του ήπατος

Νωρίς κατά την εμβρυογένεση και πριν την ανάπτυξη του ήπατος, το εγκάρσιο διαφραγματικό μεσέγγημα (*septum transversum mesenchyme*) που βρίσκεται σε επαφή με την καρδιά, είναι η δομή που θα δώσει το διάφραγμα και το κοιλιακό μεσεντέριο και που θα υποστηρίξει τη δημιουργία του ήπατος και του παγκρέατος. Στο “*septum transversum mesenchyme*” παράγονται οι BMP2 και BMP4 οι οποίες φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του ήπατος (135-137), μιας και σε γενετικά τροποποιημένους μύες στους οποίους η έκφραση της BMP4 είχε ανασταλεί (137), παρατηρήθηκε καθυστέρηση ανάπτυξης του ηπατικού κάλυκα. Όταν όμως ιστοί από αυτό το μοντέλο καλλιεργήθηκαν *ex-vivo*, αποκαταστάθηκε η ομαλή ανάπτυξη του ήπατος μετά από την προσθήκη BMP2 στο καλλιεργητικό μέσο. Επιπρόσθετα, η προσθήκη του ανταγωνιστή των BMPs, Noggin, οδήγησε σε αναστολή της ανάπτυξης του αρχέγονου ηπατικού ιστού.

Σε μύες με ετερόζυγη γενετική αποσιώπηση των Smad2 και Smad3, η ανάπτυξη του ήπατος ήταν υποπλαστική (138). Αυτό οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα στη μείωση της έκφρασης της ιντεγκρίνης b1, η οποία είναι γνωστό ότι παίζει καίριο ρόλο στην ανάπτυξη του ήπατος (139), και μπορεί να αναπληρωθεί με την προσθήκη HGF (Hepatic Growth Factor), υποδεικνύοντας τη διασύνδεση των δύο αυτών μονοπατιών κατά την ανάπτυξη του ήπατος.

Τα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF-β συμμετέχουν στη μετέπειτα ανάπτυξη του οργάνου και τη διαφοροποίηση όλων των επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών του ήπατος. Κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, η Ακτιβίνη-A και οι TGF-β2, TGF-β3 εκφράζονται κυρίως στο παρέγχυμα γύρω από τις πυλαίες ηπατικές φλέβες και προσδένονται στα ώριμα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων οδών (χολαγγειοκύτταρα). Η έκφραση του υποδοχέα TβRII φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση αυτών των κυττάρων (140). Επιπλέον, η προσθήκη TGF-β σε καλλιέργεια εμβρυϊκού ηπατικού ιστού ή ηπατοβλαστών οδηγεί στη διαφοροποίηση των ηπατοβλαστών σε χολαγγειοκύτταρα (138, 140, 141). Επίσης, ο TGF-β και η Ακτιβίνη-A έχει δειχθεί ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη των χολαγγειοκυττάρων σε καλλιέργεια (142, 143). Παράλληλα, ο ενδοκυττάριος μεταβιβαστής της BMP σηματοδότησης Smad5, εκφράζεται και αυτός κυρίως στην περιοχή

γύρω από τις πυλαίες φλέβες (144), υποδηλώνοντας την πιθανή διαπλοκή της σηματοδότησης από τους BMPs και TGF-β/Ακτιβίνες στην εξέλιξη της ωρίμανσης των χολαγγειοκυττάρων. Στα ηπατοκύτταρα, ο TGF-β δρα ως ισχυρός αναστολέας της ανάπτυξης και ως αποπτωτικός παράγοντας (145, 146), ενώ η μελέτη της επίδρασης των μορίων της υπερ-οικογένειας του TGF-β στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα (Hepatic Stellate Cells, HSC) έχει οδηγήσει σε διφορούμενα αποτελέσματα. Από τη μια φαίνεται ότι ο TGF-β οδηγεί στην ενεργοποίηση των HSC *in-vitro* (147), στην αναστολή της αυτόματης απόπτωσης των ενεργοποιημένων HSC (148) και στην ενίσχυση της μιτογόνο δράσης των PDGF και EGF (149), και από την άλλη, αναστέλλει τη μιτογόνο δράση του PDGF μειώνοντας τα επίπεδα του υποδοχέα του (150).

Ο TGF-β1 είναι μάλλον ο πιο καλά μελετημένος παράγοντας που εμπλέκεται στην ηπατική ίνωση, κυρίως λόγω της επαγωγής στοιχείων του διάμεσου χώρου (όπως κολλαγόνο τύπου I και III) από τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα (151-153). Η έκφραση του TGF-β αυξάνεται χαρακτηριστικά σε πειραματικά μοντέλα ηπατικής ίνωσης (152-158) και σε βιοψίες ασθενών με ηπατική κίρρωση (159). Επιπλέον, διαγονιδιακοί μύες που υπερεκφράζουν TGF-β1, εμφανίζουν ηπατική ίνωση (160, 161), ενώ η χρήση εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του TGF-β1, αναστρέφει την ίνωση σε ζωικά μοντέλα (162). Η επαγωγή της ίνωσης μέσω TGF-β μπορεί να επιτευχθεί, όχι μόνο λόγω της παραγωγής κολλαγόνου, αλλά και μέσω της αυξημένης απόπτωσης μετά από ηπατική βλάβη, που αυξάνει ακόμα περισσότερο τα επίπεδα του TGF-β (163, 164). Ένας άλλος μηχανισμός είναι και η επίδραση της έκφρασης του TGF-β στα επίπεδα των μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος (Matrix MetalloProteinases, MMPs) και των αναστολέων αυτών (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases, TIMPs) (165, 166).

Ο TGF-β εμπλέκεται επίσης και στην ηπατική αναγέννηση μετά από τη χειρουργική αφαίρεση τμήματος του οργάνου. Ο TGF-β υπερεκφράζεται ως ένα κύμα, με φορά από την περιοχή πέριξ της πυλαίας φλέβας προς την περιοχή πέριξ της κεντρικής φλέβας, κατά την εξέλιξη της ηπατικής αναγέννησης (167) και φαίνεται να ελέγχει τον τερματισμό της αναγεννητικής διαδικασίας, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων. Για να επιτευχθεί αυτό, είναι απαραίτητη και η συμμετοχή της Ακτιβίνης-A (168-170).

Ο TGF-β εμπλέκεται στην εμφάνιση και εξέλιξη μιας πλειάδας άλλων παθολογικών καταστάσεων στο ήπαρ, όπως οι νεοπλασίες του ηπατικού ιστού (171-174), η ηπατική βλάβη από το αλκοόλ (175) και η ιική ηπατίτιδα (176), ενώ οι BMPs εμπλέκονται κυρίως στο μεταβολισμό του σιδήρου (177, 178) μέσω της χεψιδίνης (179) και μαζί με τον TGF-β εμπλέκονται στην εμφάνιση της αιμοχρωμάτωσης (180, 181).

Κεφάλαιο 2

Σκοπός της παρούσας μελέτης

Παρά την εκτενή μελέτη του ρόλου των μορίων του TGF-β στην ανάπτυξη και ομοιόσταση του οργανισμού, καθώς και στην παθοφυσιολογία της ιστικής φλεγμονής και βλάβης, οι αποδέκτες της δράσεως αυτής σε κυτταρικό επίπεδο είναι ακόμα άγνωστοι. Άγνωστη επίσης παραμένει η συσχέτιση, σε κυτταρικό επίπεδο, των δυο βασικών κλάδων (της BMP-επαγόμενης και της TGF-β/Activin-επαγόμενης) της TGF-β σηματοδότησης, καθώς και το πώς αυτά τα μονοπάτια διαπλέκονται στην ομοιόσταση και στη νόσο.

Η ταυτοποίηση ενός τμήματος (**sbe: smad binding element**) στον υποκινητή πολλών γονιδίων που η έκφρασή τους επάγεται ισχυρά από τον TGF-β, στο οποίο προσκολλώνται τα σύμπλοκα Smad3/Smad2-Smad4 (182) επάγοντας την ενεργοποίησή τους, οδήγησε στη δημιουργία συνθετικών διαγονιδιακών κατασκευών με ειδικότητα στην TGF-β-επαγόμενη σηματοδότηση (183). Η δράση και η ειδικότητα των διαγονιδιακών αυτών κατασκευών, επαληθεύθηκε πρώτα σε κυτταρικές σειρές και στη συνέχεια με τη δημιουργία διαγονιδιακών σειρών μυών.

Παρόλα αυτά, οι σειρές αυτές δεν επέτρεψαν την ανίχνευση των κυτταρικών στόχων της TGF-β-επαγόμενης σηματοδότησης, παρά μόνο την αδρή καταγραφή των περιοχών αυτών σε επίπεδο ιστού ή οργάνου. Αυτό κρίθηκε ιδιαίτερα σημαντικό, ιδίως σε καταστάσεις ιστικής βλάβης, κατά τις οποίες ένας μικρός αριθμός διακριτών κυττάρων μπορεί να είναι ικανός να ενεργοποιήσει έναν καταρράκτη μοριακών και βιοχημικών γεγονότων, οδηγώντας τελικά στην εμφάνιση και την εγκαθίδρυση της υποκείμενης νόσου.

Στόχοι λοιπόν της παρούσας διατριβής ήταν:

- I. Να δημιουργηθούν νέες διαγονιδιακές σειρές μυών αναφοράς που θα εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη RFP στους κυτταρικούς στόχους που δέχονται σηματοδότηση από TGF-β/Ακτιβίνες, επιτρέποντας έτσι για πρώτη φορά τη μελέτη μεμονωμένων κυττάρων και όχι απλά των δομικών στόχων της συγκεκριμένης σηματοδότησης.

- II. Να διασταυρωθεί η νέα σειρά αναφοράς με αυτήν στην οποία τα κύτταρα που δέχονται σηματοδότηση από τους BMPs εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη eGFP (184), επιτρέποντας έτσι την ταυτόχρονη μελέτη των κυτταρικών στόχων των BMPs και των TGF-β/Ακτιβινών.
- III. Να προσδιοριστεί το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης των διαγονιδίων κατά την ανάπτυξη και ομοιόσταση των σημαντικότερων οργάνων του σώματος. Η έκφραση αυτή επιτελείται υπό την παρουσία των φυσιολογικών επιπέδων των ενεργοποιητών (BMPs, TGF-β, Ακτιβίνες) στον ιστό, και όχι μετά από εξωγενή αλλαγή αυτών, υπερέκφρασή τους ή μετά από τη γενετική τους αποσιώπηση ή τη μοριακή τους αναστολή.

Άμεση απόρροια των παραπάνω στόχων και συνέπεια της επιτυχούς δημιουργίας και ανάλυσης των διπλά διαγονιδιακών σειρών αναφοράς της TGF-β σηματοδότησης, αποτελεί:

- IV. Η διερεύνηση του προτύπου ενεργοποίησης των διαγονιδίων σε καταστάσεις φλεγμονής και ιστικής βλάβης, σε όργανα όπως ο πνεύμονας και το ήπαρ και του πιθανού ρόλου της υπερ-οικογένειας του TGF-β στην έναρξη αλλά και την εξέλιξη αυτών των φαινομένων.
- V. Η εν τω βάθει καταγραφή του γονιδιακού προτύπου έκφρασης συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων που εκφράζουν τα διαγονίδια, όπως τα ηπατοκύτταρα, η οποία θα συνδέσει τη γονιδιακή έκφραση με συγκεκριμένες ανατομικές περιοχές και βιολογικές λειτουργίες, αλλά και θα αναδείξει πιθανώς νέα γονίδια-στόχους της υπερ-οικογένειας του TGF-β.

Ειδικό Μέρος

Κεφάλαιο 3

Υλικά

3.1. Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιιεργειών

Τα απαιτούμενα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών αλλά και για τις πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων του πνεύμονα, αναφέρονται στον Πίνακα 2.

Προϊόν	Εταιρεία-Προέλευση	Κωδικός Προϊόντος
Θρεπτικό διάλυμα DMEM	SIGMA ALDRICH	D6546
Βόειος εμβρυϊκός ορός (Fetal Bovine Serum-FBS)	Invitrogen	10108-165
Αντιβιοτικό Πενικιλίνης/Στρεπτομυκίνης 5,000U/mL P, 5,000ug/mL S	Invitrogen	15140-122
Διάλυμα L-glutamine	SIGMA ALDRICH	G7513
Εξισορροπημένο, αλατούχο διάλυμα Hank's (Hank's balanced salt solution-HBSS)	GIBCO	24020-091
Απεσταγμένο στείρο νερό	GIBCO	10977035
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffer saline-PBS)	GIBCO	70013-016
Διάλυμα Τρυψίνης/EDTA	SIGMA ALDRICH	T3924
Liver Perfusion Medium	GIBCO	17701
Liver Digest Medium	GIBCO	17703
Hepatocyte Wash Medium	GIBCO	17704

Πίνακας 2: Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιιεργειών.

3.2. Περιοριστικά ένζυμα, βιολογικά και χημικά αντιδραστήρια μοριακών αναλύσεων

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις κλωνοποιήσεις των πλασμιδιακών φορέων, για τις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης και τις αντιδράσεις πραγματικού

χρόνου (Real-Time pcr), καθώς και για τους εν' γένει χειρισμούς τμημάτων DNA και RNA, αναφέρονται στον Πίνακα 3.

Προϊόν	Εταιρεία-Προέλευση	Κωδικός Προϊόντος
RNase/DNase free dH ₂ O	CARLO ERBA	600521
Απεσταγμένο νερό	GIBCO	10977035
Ένζυμο περιορισμού NcoI	New England Biolabs (N.E.B.)	R0193
Ένζυμο περιορισμού XbaI	N.E.B.	R0145
Ένζυμο περιορισμού BamHI	N.E.B.	R0136
Ένζυμο περιορισμού Sall	N.E.B.	R0138
Ένζυμο περιορισμού HindIII	N.E.B.	R0104
Ένζυμο περιορισμού EcoRI	N.E.B.	R0101
Ένζυμο περιορισμού FseI	N.E.B.	R0588
Ένζυμο περιορισμού SphI	N.E.B.	R0182
Ένζυμο περιορισμού HpaI	N.E.B.	R0105
Ένζυμο περιορισμού KpnI	Fermentas	ER0521
Ένζυμο περιορισμού MluI	Fermentas	ER0562
Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin-BSA) x100	N.E.B.	B9001
NEBuffer 1	N.E.B.	B7001
NEBuffer 2	N.E.B.	B7002
NEBuffer 3	N.E.B.	B7003
NEBuffer 4	N.E.B.	B7004
NEBuffer EcoRI	N.E.B.	B0101
10X Buffer KpnI	Fermentas	B29
10X Buffer R	Fermentas	BR5
10X Buffer Tango™	Fermentas	BY5
Αλκαλική Φωσφατάση Γαρίδας, Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas	EF0511
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas	K1422
Μικροστήλες Elutip-d	Whatman	10462617
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	28704
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12362
PolyFect Transfection Reagent	Qiagen	301107
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	27106
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega	A2492
Αγαρόζη	SIGMA ALDRICH	A9539
Αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως	SIGMA ALDRICH	A9414
Αμπικιλίνη	SIGMA ALDRICH	A-8351
Καναμικίνη	Gibco	11815024
Γλυκερόλη	Roth	3783.1
DH5a στελέχη του βακτηρίου E. coli, ικανά για πλασμιδιακό μετασχηματισμό με τη χρήση ηλεκτρικού φορτίου	Παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο	
TRI REAGENT®	MRC	TR118
Χλωροφόρμιο	CARLO ERBA	67-66-3
Ισοπροπανόλη	CARLO ERBA	415156
Απόλυτη αιθανόλη	CARLO ERBA	414608

Αγαρόζη	SIGMA	A9539
Βρωμιούχο αιθίδιο	Applichem	A1152,0025
6x διάλυμα φόρτωσης για DNA	Fermentas	R0611
2x διάλυμα φόρτωσης για RNA	Fermentas	R0641
GeneRuler™ 100bp DNA ladder	Fermentas	SM0241
GENE RULER EXPRESS DNA LADDER	Fermentas	SM1553
Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) 10mM	Promega	U1515
10x RQ1 Ρυθμιστικό διάλυμα	Promega	M6101
RQ1 Δεοξυριβονουκλεάση (DNase) 1U/μg	Promega	M610A
RQ1 stop solution	Promega	M610A
Μίγμα τυχαίων εκκινητών (random primers)	Invitrogen	48190-011
Αντίστροφη μεταγραφάση M-MLV RT (200U)	Promega	M1705
5x Ρυθμιστικό διάλυμα της RT	Promega	M5313
RNase out™	Invitrogen	10777-019
Taq DNA πολυμεράση	N.E.B.	M0267L
Thermo 10x ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης	BioLabs	B9004S
Φθορίζουσα πολυμεράση-SYBR® greenER™	Invitrogen	11762-500
dCTP Ap ³² 250μCi	Amersham	AA0005
Hybond N ⁺ nylon membrane	Amersham	RPN119B
Klenow Fragment	N.E.B.	M0212L
LigaFast™ Rapid DNA Ligation System	Promega	M8221
Protein G on cross-linked 4% beaded agarose fast flow	SIGMA ALDRICH	P4691
Luria Broth	SIGMA-ALDRICH	L3022
Luria Broth agar	SIGMA-ALDRICH	L3147
RNeasy Micro Kit	Qiagen	74004
TruSeq RNA Sample Preparation Kits v2	Illumina	RS-122-2001
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies	5067-4626
NaCl	Riedel-de Haen	31434
Αγαρόζη	SIGMA ALDRICH	A9539

Πίνακας 3: Περιοριστικά ένζυμα, βιολογικά και χημικά αντιδραστήρια μοριακών αναλύσεων.

3.3. Ένζυμα πέψης του πνευμονικού και ηπατικού ιστού

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του πνευμονικού και ηπατικού ιστού και την απομόνωση και περαιτέρω μελέτη των πνευμονοκυττάρων και ηπατοκυττάρων αντίστοιχα, αναφέρονται στον πίνακα 4.

Προϊόν	Εταιρεία-Προέλευση	Κωδικός Προϊόντος
Διάλυμα Κολλαγενάσης/Δισπάσης	Roche	10269638001
Ελασάση	Sigma-Aldrich	45124
Dnase I	Sigma-Aldrich	DN25
Liver Digest Medium	GIBCO	17703
Διάλυμα Κολλαγενάσης	Sigma-Aldrich	C5138

Πίνακας 4: Ένζυμα πέψης του πνευμονικού και ηπατικού ιστού.

3.4. Αναισθητικά και ουσίες επαγωγής ιστικής βλάβης

Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή και χορήγηση στους μύες της αναισθησίας, καθώς και οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή ιστικής βλάβης στον πνεύμονα και το ήπαρ των υπό μελέτη ζωικών προτύπων, αναφέρονται στον Πίνακα 5.

Προϊόν	Εταιρεία-Προέλευση	Κωδικός Προϊόντος
Κεταμίνη(IMALGENE 1000)	Merial	301003
Ξυλαζίνη (Rompun)	Bayer	-
Ατροπίνη θειική	Demo SA Greece	-
Μπλεομυκίνη	Nippon Kayaku co ltd	-
Ναφθαλένιο	Sigma-Aldrich	184500-250G
Οβαλβουμίνη	Sigma-Aldrich	A-5503
Κονκαναβαλίνη Α	Sigma-Aldrich	C2010

Πίνακας 5: Αναισθητικά και χημικές ουσίες ιστικής βλάβης.

3.5. Αλληλουχίες εκκινητών

Οι αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, αναφέρονται στον Πίνακα 6.

Γονίδιο	Πρόσθιος εκκινητής (5'→3')	Ανάστροφος εκκινητής(5'→3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Ta (°C)
Gapdh	CCAGTATGACTCCAATCACG	CTCCTGGAAGATGGTGATGG	97	56
RFP1b	ATCCCCGACTACTTGAAG	CATGTAGGTGGTCTTGAC	312	58
Id-1	GGCGAGATCAGTGCCTTG	AAGGGCTGGAGTCCATCTG	106	58
eGFP	ACCACTACCTGAGCACCCAGTC	GTCCATGCCGAGAGTGATCC	110	58
RFP1 long	GCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAG	CGCCGGTGGAGTGGCGGCC	670	64

Πίνακας 6: Αλληλουχίες εκκινητών.

3.6. Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διάκριση των κυτταρικών πληθυσμών με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, αλλά και τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στον ανοσοφθορισμό και στο ανοσοσύστημα κατά Western, αναφέρονται στον Πίνακα 7.

Αντισώματα για Κυτταρομετρία ροής				
Ειδικότητα αντισώματος	Συζευγμένο με:	Ισότυπος	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
CD31	APC	Rat IgG2α,κ	eBioscience	17-0311-82
CD45	APC	Rat IgG2b,κ	eBioscience	17-0451-82
EPCAM	PE-Cy7	Rat IgG2α,κ	eBioscience	25-5791-80
ratIgG1	APC	Rat IgG1,κ	eBioscience	17-4301-81
ratIgG1	PE-Cy7	ratIgG1,λ	BD Biosciences	552869
Πρωτογενή αντισώματα για Ανοσοφθορισμό				
Ειδικότητα αντισώματος	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου	Αραίωση εργασίας	
anti-Red Fluorescent Protein , rat	ANTIBODIES-ONLINE	ABIN334653	1:100	
anti-GFP, chicken	ABCAM	ab13970	1:500	
Anti-Glutamine Synthase, rabbit	ANTIBODIES-ONLINE	ABIN398821	1:200	
Anti-SOX9, rabbit	MERCK MILLIPORE	AB5535	1:200	
Anti-pro- SpC, rabbit	MERCK MILLIPORE	AB3786	1:500	
Anti-T1alpha, hamster	HYBRIDOMA BANK	8.1.1	1:200	
Anti-CGRP, rabbit	SIGMA-ALDRICH	C8198	1:1000	
Anti- MHC Class II , rat FITC	IMMUNOSOURCE	11-5321-82	1:200	
Anti-Cytokeratin8, rabbit	HYBRIDOMA BANK	TROMA-I	1:50	
Anti-Cytokeratin5, rabbit	ABCAM	ab24647	1:250	
Anti-Uea1-biotin	Vector Labs	B-1065	1:200	
Lysozyme	Dako	A 0099	1:200	
Anti-C-peptide, rabbit	MERCK MILLIPORE	4020-01		
Anti-alpha 1 Fetoprotein, rabbit	ABCAM	ab46799	1:100	
Anti- DLK, rabbit	ABCAM	ab21682	1:200	
Anti- Cytokeratin 19, rabbit	ABCAM	ab52625	1:200	
anti-EpCAM-biotin, rat	eBioscience	13-3249-80	1:100	
anti-s100A4 (FSP-1), rabbit	Dako	A5114	1:200	
anti- Collagen 1, rabbit	Chemicon	AB765P	1:50	
anti-Actin a-smooth muscle- CY3, mouse	SIGMA ALDRICH	C6198	1:500	
Anti-CD45, rat	BD Biosciences		1:400	
Δευτερογενή αντισώματα για Ανοσοφθορισμό				
Ειδικότητα αντισώματος	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου	Αραίωση εργασίας	
Anti-rat IgG goat Alexa 594	Invitrogen	A11007	1:200	
Anti-Chicken IgY (IgG) Donkey FITC	JACKSON IMMUNORESEARCH	703-095-155	1:200	
Anti-hamster IgG goat Alexa 647	Molecular probes	A21451	1:200	

Anti-rabbit IgG donkey Cy5	JACKSON IMMUNORESEARCH	711-176- 152	1:200
Streptavidin, Alexa Fluor 488 conjugate	Invitrogen	S11223	1:500
anti-rabbit IgG goat Chromeo 488	Active Motif	15041	1:200
Πρωτογενή αντισώματα για Ανοσοσύπωμα κατά Western			
Ειδικότητα αντισώματος	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου	Αραίωση εργασίας
Anti- phospho smad 2, rabbit	Cell Signaling	3101S	1:1000
Anti- smad 2-3, rabbit	Cell Signaling	3102	1:1000
Anti- GAPDH, mouse	Chemicon	MAB374	1:1000
Anti-phospho-smad1 smad5/smاد8, rabbit	MERCK MILLIPORE	AB3848	1:1000
Anti-smad1, mouse	Santa Cruz	Sc-81378	1:1000
Δευτερογενή αντισώματα για Ανοσοσύπωμα κατά Western			
Ειδικότητα αντισώματος	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου	Αραίωση εργασίας
Anti-rabbit IgG-HRP conjugated, goat	JACKSON IMMUNORESEARCH	111-035- 003	1:10.000
Anti-mouse IgG-HRP conjugated, rabbit	JACKSON IMMUNORESEARCH	PAB0096	1:10.000

Πίνακας 7: Αντισώματα.

3.7. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο σημαντικότερος εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, αναφέρεται στον Πίνακα 8.

Μηχανήματα	Εταιρεία
Κυτταρομετρικός διαχωριστής FACSAria	Becton Dickinson
Κλίβανος Επωαστικός CO2 Μονός Stericycle 381	Forma Scientific
Φυγόκεντρος μικροσωληναρίων	Labnet International
Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού E-pure	BARNSTEAD
Θάλαμος νηματικής ροής AC2-5E1	ESCO
Φυγόκεντρος επιτραπέζια ψυχόμενη	Hermle
Κρυοστάτης αυτόματος CM 1950	LEICA
Ομογενοποιητής PT1600E	Polytron
Μικροσκόπιο φθορισμού LEICA DMRA2	Leica
Ανάστροφο μικροσκόπιο LEICA DMLSR	Leica
Θερμικός κυκλοποιητής	DNA Engine DYAD

Θερμικός κυκλοποιητής Peltier DNAEngine για qRT-PCR	Bio-Rad
Συσκευή εξοπλισμένη με λάμπα υπεριώδους φωτός και βιντεοκάμερα τύπου Dolphin-Doc	Wealtec
Πεχάμετρο	Eppendorf
Φωτόμετρο	Eppendorf
Ξηραντήρας κενού αέρος	Eppendorf
Αναδευόμενος επωαστήρας (37 ⁰ C)	UVP
Μηχανή Vortex VX100	Labnet
Θάλαμος νηματικής ροής	Nuarir
Φυγόκεντρος ψυχόμενη τύπου Multifuge 3S-R για σωλήνες falcon	Heraeu
Φυγόκεντρος ψυχόμενη τύπου Biofuge fresco για eppendorfs	Heraeus
Θερμαινόμενη πλάκα, HB-2	Wealtec
Καταψύκτης Biomedical 4 ο C	Sanyo
Καταψύκτης -20 ο C	Whirpool
Καταψύκτης Biomedical -20 ο C	Sanyo
Καταψύκτης Forma ULT -86 ο C	Thermo Electron Corporation
Καταψύκτης 4 ο C	Pitsos
Συσκευές ηλεκτροφόρησης για πήκτωμα αγαρόζης	Biorad
Συσκευή μέτρησης αυτοραδιοαγραφίας Typhoon 9410	Amersham
Φασματοφωτόμετρο NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific
Βιοαναλυτής Agilent 2100	Agilent Technologies

Πίνακας 8: Εργαστηριακός εξοπλισμός.

3.8. Διαλύματα εργασίας

Τα βασικά διαλύματα εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, περιγράφονται παρακάτω.

Για την ανίχνευση γενετικού υλικού κατά Southern:

<u>2xTES</u>	<u>Hyb-SDS (For 2lt)</u>
20mM Tris-HCL pH8	132gr Na ₂ HPO ₄
2mM EDTA	34,5gr NaH ₂ PO ₄
1%SDS	140gr SDS
	0.4 ml EDTA 0,5M
	H ₂ O έως τα 2lt

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από ιστό:

TNES buffer (pH 7.5):
50 mM Tris
0.4 M NaCl
100 mM EDTA
0.5 % SDS

Για το ανοσοστύπωμα κατά Western:

<u>Διάλυμα κυτταρικής λύσης</u>	<u>Sample buffer, 4X</u>	<u>Running buffer</u>	<u>Διάλυμα μεταφοράς</u>	<u>Διάλυμα αποκόλλησης των αντισωμάτων</u>
20 mM β- glycerophosphate	0.33 M Tris/HCl pH 6,8	25 mM Tris- base	25 mM Tris	100 mM β- μερκαπτοαιθανόλ η
20 mM NaF	10% (w/v) SDS	192 mM Γλυκίνη	192 mM Γλυκίνη	2% (w/v) SDS
2 mM EDTA	13% (v/v) γλυκερόλη	0.1% (w/v) SDS	20% (v/v) Μεθανόλη	62.5 mM Tris/HCl pH 6.7
0.2 mM Na ₃ VO ₄	20% (v/v) β- μερκαπτοαιθανόλ η			
20 mM Hepes pH 7,5	0.2% (w/v) κυανούνη της βρωμοφαινόλης			
10 mM benzamidine				
0.5% (v/v) Triton X- 100				

Κεφάλαιο 4

Μέθοδοι

4.1. Πειραματόζωα

Τα πειράματα έγιναν σε θηλυκούς διαγονιδιακούς μύες TRE-RFP, BRE-eGFP, διπλά διαγονιδιακούς μύες TRE-RFP/BRE-eGFP και σε μύες-μάρτυρες αγρίου τύπου της φυλής C57BL/6, στις ηλικίες που αναφέρονται σε κάθε πείραμα. Η αποικία των μυών αναπτύχθηκε στον οίκο πειραματόζωων του Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α. υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και ρυθμού φωτός-σκότους (12h-12h), σε ατομικά αεριζόμενα κλουβιά και ήταν απαλλαγμένη παθογόνων μικροοργανισμών όπως ελέγχτηκε από περιοδικό εξωτερικό υγειονομικό έλεγχο. Όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα ήταν σύμφωνα με τις εθνικές και κοινοτικές οδηγίες περί προστασίας των ζώων και έλαβαν άδεια από την κτηνιατρική υπηρεσία της Νομαρχίας Αθηνών και την επιτροπή Βιοηθικής του Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α.

4.2. Κλωνοποιήσεις - Πλασμιδιακές πέψεις - Ανάπτυξη βακτηρίων - Απομόνωση πλασμιδίων

Οι κλωνοποιήσεις τμημάτων DNA για τη δημιουργία της διαγονιδιακής κατασκευής, έγιναν με τη χρήση της εμπορικά διαθέσιμης ομάδας αντιδραστηρίων LigaFast™ Rapid DNA Ligation System της εταιρίας Promega, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε μετασηματισμός των προϊόντων της κλωνοποίησης σε κατάλληλα προετοιμασμένα στελέχη του βακτηρίου E. Coli και καλλιέργειά τους σε τρυβλία με στείρο Luria Broth θρεπτικό άγαρ, παρουσία 100μl/ml αμπικιλίνης ή 50μl/ml καναμυκίνης, ανάλογα με την ανθεκτικότητα του προς μελέτη πλασμιδιακού φορέα στην αμπικιλίνη ή καναμυκίνη, αντίστοιχα. Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν μετά από ολονύχτια επώαση στους 37°C, μεταφέρθηκαν σε στείρο Luria Broth υγρό θρεπτικό μέσο παρουσία των αντίστοιχων αντιβιοτικών, για να αναπτυχθούν μόνο οι βακτηριακοί κλώνοι που φέρουν το προς μελέτη πλασμίδιο.

Η απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων από τα φέροντα βακτήρια έγινε με τη χρήση της εμπορικά διαθέσιμης ομάδας αντιδραστηρίων: EndoFree Plasmid Maxi Kit (κωδικός: 12362), ή QIAprep Spin Miniprep Kit (κωδικός: 27104) της εταιρίας Qiagen, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η πέψη των πλασμιδιακών φορέων με τη χρήση ενζύμων περιορισμού, έγινε για μια ώρα στην κατάλληλη θερμοκρασία, όταν η ποσότητα του προς πέψη πλασμιδίου ήταν 1μg, ή 3 ώρες στην κατάλληλη θερμοκρασία, όταν η ποσότητα του προς πέψη πλασμιδίου ήταν μεγαλύτερη από 1μg. Για κάθε ένζυμο περιορισμού χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες που προτείνει ο κατασκευαστής. Τα προϊόντα της πέψης ανιχνεύθηκαν μετά από ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης και τη χρήση κατάλληλης DNA κλίμακας (DNA ladder).

4.3. Καλλιέργεια της HeLa κυτταρικής σειράς - Διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς

Η HeLa σειρά ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων (185) του τράχηλου της μήτρας, χρησιμοποιήθηκε ως μέσο για τη συν-διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς που εκφράζουν τη διαγονιδιακή κατασκευή ή/και τα cDNAs των Smad3 και Smad7 γονιδίων του ανθρώπου. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε παρουσία θρεπτικού μέσου DMEM, εμπλουτισμένου με 10% εμβρυικό βόειο ορό (FBS), 2mM L-γλουταμίνη και 1% Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη. Η διαμόλυνση των κυττάρων έγινε με το εμπορικά διαθέσιμο μέσο διαμόλυνσης PolyFect (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, HeLa κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6-οπών και όταν η επικάλυψη των κυττάρων έφτασε το 70-90% της καλλιεργητικής επιφάνειας, ακολούθησε η διαμόλυνση. Τεσσερισήμισι (4,5) ώρες μετά τη διαμόλυνση με τους πλασμιδιακούς φορείς, ακολούθησε προσθήκη, όπου αναφέρεται, 1ng/ml ανασυνδυασμένης ανθρώπινης πρωτεΐνης TGF-β1 (R&D Systems), ή 50ng/ml ανασυνδυασμένης ανθρώπινης πρωτεΐνης BMP-4 (R&D Systems), ή 2μg/ml αντισώματος έναντι των TGF-b1,2,3. Εικοσιτέσσερις (24) ώρες μετά τη διαμόλυνση, ποσοτικοποιήθηκε η μέση ένταση φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity, M.F.I.) των κυτταρικών πληθυσμών ανά συνθήκη, με κυτταρομετρία ροής.

4.4. Κυτταρομετρία ροής – Κυτταροδιαχωρισμός

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια σύγχρονη, αυτοματοποιημένη, ποσοτική και ποιοτική μέθοδος χαρακτηρισμού μεμονωμένων κυττάρων με βάση το φθορισμό που εκπέμπεται από τα σημασμένα-με φθοριόχρωμα- αντισώματα που προσδένονται σε αντίστοιχους αντιγονικούς επιτόπους των κυττάρων αυτών (186). Συγκεκριμένα, ο κυτταρομετρητής ροής χρησιμοποιεί μία ή περισσότερες δέσμες laser και έναν ή περισσότερους ανιχνευτές φωτός ώστε να μετρά μεμονωμένα, άθικτα κύτταρα σε δείγμα εναιωρήματος αυτών. Υπό κατάλληλη πίεση επιτυγχάνεται η δημιουργία συνεχούς ροής μεμονωμένων κυττάρων που παρεμβάλλεται ανάμεσα από τα laser και από τους ανιχνευτές της συσκευής. Κάθε φορά που ένα κύτταρο διέρχεται από τη δέσμη, το φως ανακλάται από τον ανιχνευτή και αυτή η διακοπή στη δέσμη του laser καταγράφεται. Τα κύτταρα που φέρουν δεσμευμένα αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες στα αντιγόνα της κυτταρικής τους επιφάνειας ή ενδοκυττάρια, διεγείρονται από το laser και εκπέμπουν ακτινοβολία, η οποία καταγράφεται από ένα δεύτερο σύστημα ανίχνευσης. Κατάλληλο λογισμικό σε συνδεδεμένο υπολογιστή αναπαριστά το ιστόγραμμα κατανομής συχνοτήτων (histogram), στο οποίο παρουσιάζεται στον άξονα ψ ο αριθμός των κυττάρων και στον άξονα x, η ένταση του παραγόμενου φθορισμού. Σε συνδυασμό με τις συγκεκριμένες γραφικές παραστάσεις, τα παραγόμενα σήματα εμφανίζονται και με στικτογράμματα (dot plots), στα οποία φαίνεται η κατανομή των κυτταρικών πληθυσμών σε διαφορετικές θέσεις, ανάλογα με το πρότυπο φθορισμού τους.

Ο κυτταρομετρικός διαχωρισμός (Cell Sorting) αποτελεί την εξέλιξη της κυτταρομετρίας ροής (187), σύμφωνα με τον οποίο, δεν επιτυγχάνεται μόνο ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός και η ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη κυτταρικών πληθυσμών, αλλά ταυτόχρονα επιτυγχάνεται και η απομόνωσή τους. Αυτό επιτελείται με την εφαρμογή ηλεκτρικού φορτίου στα κύτταρα της δέσμης μονήρων κυττάρων, ανάλογα με το πρότυπο φθορισμού τους και η μεταφορά τους σε διακριτά σωληνάρια, μετά την εκτροπή των φορτισμένων κυττάρων που συντελείται κατά τη διέλευσή τους από τις πλάκες εκτροπής της συσκευής.

Συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη, οι μέθοδοι αυτοί επιτρέπουν την ανίχνευση των ενδογενών φθοριοχρωμάτων που εκφράζουν οι διαγονιδιακοί μύες αναφοράς (eGFP για το BRE-eGFP και mRFP για το TRE-RFP αντίστοιχα), αλλά και τον επιμέρους χαρακτηρισμό των

κυτταρικών πληθυσμών των υπό μελέτη οργάνων. Για κάθε κυτταρικό πληθυσμό που μελετήθηκε έχουμε τα εξής τρία δείγματα:

1) Το **δείγμα αρνητικός μάρτυρας των ενδογενών φθοριοχρωμάτων**, στο οποίο δεν εκφράζονται τα φθοριοχρώματα eGFP και mRFP. Το δείγμα προέρχεται από μυ άγριου τύπου που έχει υποστεί την ίδια επεξεργασία, όπως και οι διαγονιδιακοί μύες.

2) Το **δείγμα αρνητικός μάρτυρας των αντισωμάτων**, στο οποίο δεν έχει προσδεθεί κανένα αντίσωμα, ώστε να αποτελεί το μάρτυρα για τον αυτοφθορισμό του κάθε κυτταρικού τύπου.

3) Το **ισοτυπικό δείγμα** (isotype control), στο οποίο έχει προσδεθεί ισοτυπικό αντίσωμα. Πρόκειται για αντίσωμα ίδιου υποτύπου, ίδιας συγκέντρωσης και ίδιας αναλογίας πρωτεΐνης-φθοριοχρώματος με το μονοκλωνικό αντίσωμα που θα χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο του εκάστοτε κυτταρικού πληθυσμού, αλλά χωρίς κάποια ειδικότητα για οποιονδήποτε επίτοπο αυτού. Έτσι, κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των διαγραμμάτων που προκύπτουν από τον κυτταρομετρητή ροής, εξαιρείται η κατανομή των σημάτων του ισοτυπικού δείγματος, ώστε να προσδιοριστεί το τμήμα της κατανομής που αντιστοιχεί στην ειδική δέσμευση του μονοκλωνικού αντισώματος και αναλογεί στο αληθώς θετικό σήμα από κάθε κυτταρικό πληθυσμό.

4) Το **δείγμα ελέγχου**, στο οποίο για κάθε κυτταρικό πληθυσμό που εξετάζεται, έχει προστεθεί αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα έναντι του αντίστοιχου δείκτη που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού.

Συγκεκριμένα, για τη μελέτη των επιμέρους κυτταρικών τύπων του πνεύμονα, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα:

1. Το αντίσωμα έναντι του δείκτη επιφανείας CD45 συζευγμένο με το φθοριόχρωμα αλλοφυκοκυανίνη (APC), για το διαχωρισμό των αιμοποιητικών κυττάρων
2. Το αντίσωμα έναντι του δείκτη επιφανείας CD31 συζευγμένο με το φθοριόχρωμα αλλοφυκοκυανίνη (APC), για το διαχωρισμό των ενδοθηλιακών κυττάρων
3. Το αντίσωμα έναντι του δείκτη επιφανείας EpCAM συζευγμένο με το φθοριόχρωμα φυκοερυθρίνη-κυανίνη 7 (PE-Cy7), για το διαχωρισμό των επιθηλιακών κυττάρων

Το μεγαλύτερο ποσοστό των εναπομεινάντων κυττάρων που δεν εκφράζουν κανέναν από τους παραπάνω δείκτες (Lineage negative) αποτελείται από παρεγχυματικά κύτταρα, ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα με πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης του δείκτη EpCAM. Το πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της βιωσιμότητας των συνολικών κυττάρων του πνεύμονα που απομονώθηκαν
2. Επαναίωση των κυττάρων σε διάλυμα HBSS⁺⁺, ώστε να προκύψει συγκέντρωση 10^6 κύτταρα/100 μl διαλύματος
3. Προσθήκη 10 μl Fc Blocking/ 10^6 κύτταρα και επώαση των κυττάρων για 10 λεπτά στους 4°C , ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική σύνδεση των αντισωμάτων σε Fc υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων
4. Μεταφορά 10^7 κυττάρων από το συνολικό εναίωμα των κυττάρων του πνεύμονα σε σωληνάκι κυτταρομετρίας ροής, στο οποίο θα γίνει η τελική καταγραφή και μεταφορά 1×10^6 κυττάρων/σωληνάκι σε 5 σωληνάκια κυτταρομετρίας ροής, τα οποία αποτελούν τα δείγματα μαρτύρων και το ιστυπικό δείγμα ελέγχου
5. Στα σωληνάκια κυτταρομετρίας ροής που περιέχουν 10^7 κύτταρα προστίθενται τα εξής αντισώματα:
5 μl αντισώματος anti-mouse CD45-APC, 5 μl αντισώματος anti-mouse EpCAM-PE-Cy7 και 5 μl αντισώματος anti-mouse CD31-APC
6. Σε κάθε ένα από τα πέντε σωληνάκια κυτταρομετρίας ροής που περιέχουν 1×10^6 κύτταρα (δείγματα μάρτυρες) προστίθενται 1 μl από το αντίστοιχο αντίσωμα σύμφωνα με το παρακάτω πίνακα:

	1.δείγμα μάρτυρας	2.δείγμα μάρτυρας	3.δείγμα μάρτυρας	4.δείγμα μάρτυρας
CD45-APC	√			
EpCAM-PE-Cy7		√		
CD31-APC			√	
Isotypes				√

Το ισοτυπικό δείγμα ελέγχου περιέχει 1 μl rat IgG1-APC, και 1 μl rat IgG1 PE-Cy7. Το 5ο δείγμα μάρτυρας δεν περιέχει κανένα αντίσωμα (unstained δείγμα)

1. Επώαση των κυττάρων στους 4°C, για 30 λεπτά, στο σκοτάδι
2. Προσθήκη 1 ml διαλύματος HBSS⁺⁺ και φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C
3. Αφαίρεση του υπερκειμένου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 500 μl διαλύματος HBSS⁺⁺
4. Τα δείγματα φυλάσσονται στους 4°C
5. Καταγραφή του προτύπου έκφρασης των κυτταρικών πληθυσμών του πνεύμονα και συσχέτισή του με την έκφραση των φθοριοχρωμάτων αναφοράς eGFP και mRFP

Για την απομόνωση των eGFP θετικών, mRFP θετικών, διπλά θετικών και διπλά αρνητικών ηπατοκυττάρων, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του κυτταροδιαχωρισμού, χωρίς την επιπλέον χρώση των υπό μελέτη κυττάρων (188), αλλά με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αυτών (πρότυπο πρόσθιου και πλάγιου σκεδασμού). Λόγω του μεγάλου μεγέθους των ηπατοκυττάρων και τις ευαισθησίας τους σε μηχανικούς χειρισμούς, χρησιμοποιήθηκε στόμιο 130μm και χαμηλές πιέσεις ροής στον κυτταροδιαχωριστή.

Στην παρούσα μελέτη, και για την κυτταρομετρία ροής και για τον κυτταροδιαχωρισμό, χρησιμοποιήθηκε ο Κυτταρομετρικός διαχωριστής FACSARIA της BD, της μονάδας κυτταρομετρίας του I.IB.E.A.A.

4.5. Ανίχνευση γενετικού υλικού κατά Southern

Ο έλεγχος της ένθεσης του διαγονιδίου στο γένωμα των γενετικά τροποποιημένων TRE-RFP μυών έγινε με την τεχνική ανίχνευσης γενετικού υλικού κατά Southern (189), ως εξής:

1. Ενζυμική πέψη ολικού DNA, το οποίο απομονώθηκε όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.6, από τους TRE-RFP Founders, με το ένζυμο περιορισμού EcoRI και ολονύχτια επώαση στους 37°C

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	x1 (μl)
DNA	23,6
BSA	3
EcoRI buffer	3
EcoRI (100 U/μl)	0,4
Σύνολο	20

2. Προσθήκη 6 μl χρωστικής φόρτωσης Orange G και ηλεκτροφόρηση σε 0,8% πηκτώματος αγαρόζης με διάλυμα 1xTAE. Το πήκτωμα, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, μεταφέρθηκε σε συσκευή που είναι εξοπλισμένη με υπεριώδες φως, στην οποία γίνεται η αξιολόγηση του αποτελέσματος της πέψης
3. Αποπουρίνωση του DNA εντός του πηκτώματος, μετά από επώαση σε διάλυμα 0,2 M HCl για 15-20 λεπτά, υπό ήπια ανάδευση
4. Πλύση με διάλυμα μετουσίωσης (0,5 M NaOH/1,5 M NaCl) και επώαση για 45-60 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση
5. Εμβάπτιση μιας Nylon μεμβράνης (Amersam Hybond N⁺) και δυο Whatman χαρτιών σε H₂O και μετά σε διάλυμα μετουσίωσης
6. Επικάλυψη ενός τμήματος οριζόντιας επιφάνειας με διαφάνεια και μεταφορά σε αυτήν του πηκτώματος αγαρόζης, με την επιφάνεια των οπών φόρτωσης να βρίσκονται προς τα κάτω
7. Εναπόθεση πάνω στο πήκτωμα, με τη σειρά, της μεμβράνης Hybond και ύστερα των 2 Whatman χαρτιών. Στο όλο σύστημα εφαρμόζεται βάρος για τη μεταφορά του DNA από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Ολονύκτια επώαση
8. Λήψη της μεμβράνης και εμβάπτιση σε διάλυμα εξουδετέρωσης
9. Όσο είναι ακόμα υγρή η μεμβράνη, μεταφορά της στη συσκευή UV crosslinker όπου γίνεται η διασύνδεση του DNA
10. Μεταφορά της μεμβράνης σε κύλινδρο υβριδισμού και προσθήκη 20 ml διαλύματος Hyb-SDS που έχει προθερμανθεί στους 65°C. Επώαση για μια ώρα στους 65°C
11. Σε ένα σωληνάριο erppendorf μεταφέρονται:

5 μl RFP ιχνηθέτη (30 ng/μl)	Επώαση για 5 λεπτά σε βραστό νερό και για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
5 μl CMV ιχνηθέτη (30 ng/μl)	
5 μl διαλύματος τυχαίων εκκινήτων	

12. Προσθήκη στο σωληνάριο:

5 μl διαλύματος dCTP	Επώαση για 30-60 λεπτά στους 37°C
5 μl Klenow	
3 μl διαλύματος P ³² dCTP	

13. Προσθήκη στο σωληνάριο 25 μl 2XTES

14. Μεταφορά των 50 μl των ιχνηθετών σε μια στήλη G50 και φυγοκέντρηση στις 1800 στροφές για δυο λεπτά

15. Μεταφορά του εκλουόμενου διαλύματος σε νέο σωληνάριο και επώαση για πέντε λεπτά στους 100°C

16. Προσθήκη του διαλύματος των ιχνηθετών σε 20 ml Hyb-SDS (αυτά που ήδη βρίσκονται στον κύλινδρο υβριδισμού) και επώαση όλο το βράδυ στους 65°C

17. Απόρριψη του Hyb-SDS και πλύση του κυλίνδρου που περιέχει τη μεμβράνη, με 50-100 ml διαλύματος πλύσης (0,3Xssc/0.1%SDS), για μία ώρα στους 65°C

18. Απόρριψη του διαλύματος πλύσης και μεταφορά της μεμβράνης σε διαφάνεια. Μέτρηση της εκπεμπόμενης ραδιενέργειας με συσκευή Geiger και επανάληψη των πλύσεων, αν τα επίπεδα ραδιενέργειας είναι υψηλά

19. Μεταφορά της μεμβράνης σε κασέτα phosforimager και επώαση όλη τη νύχτα

20. Εμφάνιση της εκπεμπόμενης -στην κασέτα phosforimager- ακτινοβολίας, με τη χρήση της συσκευής μέτρησης αυτοραδιοαγραφίας Typhoon 9410

4.6. Απομόνωση DNA - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Για την γονοτύπηση των γενετικά τροποποιημένων μυών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, έγινε απομόνωση γενωμικού DNA από ένα μικρό τμήμα της άκρης της ουράς, από μύες ηλικίας 8-12 ημερών. Το πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Απομόνωση τμήματος μήκους 0.5-1.5 cm από την άκρη της ουράς και μεταφορά σε σωληνάκι eppendorf
2. Προσθήκη 600 μl διαλύματος TNES (το διάλυμα προθερμαίνεται στους 65°C μέχρι να γίνει διαυγές και χωρίς ίζημα)
3. Προσθήκη 350 μg (3-4 μl) πρωτεΐνάσης K (η πρωτεΐνάση μπορεί να προστεθεί και στο μίγμα του TNES και να μοιραστούν από κοινού)
4. Επώαση στους 55°C για 16 ώρες ή μέχρι ο ιστός να αποδομηθεί
5. Προσθήκη 167 μl κορεσμένου (~6M) διαλύματος NaCl. Έντονη ανάδευση (vortex) για 15 δευτερόλεπτα
6. Φυγοκέντρηση σε 13.000 στροφές για 20-30 λεπτά στους 4°C
7. Μεταφορά του υπερκλειμένου σε καθαρό 1.5 ml σωληνάκι eppendorf
8. Προσθήκη ίσου όγκου κρύας, 95% αιθανόλης. Ήπια ανάδευση για να κατακρημνισθεί το DNA
9. Φυγοκέντρηση σε 13.000 στροφές για 20-30 λεπτά στους 4°C
10. Απόρριψη της αιθανόλης. πλύση του ιζήματος του DNA με κρύα 70% αιθανόλη και φυγοκέντρηση σε 13.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C
11. Απόρριψη της αιθανόλης και στέγνωμα του ιζήματος στον αέρα
12. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 200 μl στείρου νερού

Για να ανιχνευτεί ο γονότυπος των γενετικά τροποποιημένων μυών, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR, κατά την οποία γίνεται ενίσχυση τμήματος του διαγονιδίου. Είναι απαραίτητο να υπάρχει και ένα δείγμα που χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας και

περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από DNA, όπως επίσης και ένα δείγμα μάρτυρας που προέρχεται από μν άγριου τύπου, που δε φέρει το προς ανίχνευση διαγονίδιο . Με τον αρνητικό μάρτυρα ελέγχεται η ύπαρξη ενδεχόμενης επιμόλυνσης κατά την προετοιμασία της αντίδρασης. Όταν υπάρχει επιμόλυνση, η αντίδραση PCR δε θεωρείται επιτυχής διότι πιθανόν αντί να ενισχυθεί το DNA του δείγματος που μας ενδιαφέρει, έχει ενισχυθεί το DNA του ξένου οργανισμού που μόλυνε το mastermix.

Το πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Προετοιμασία του mastermix στο οποίο περιέχονται όλα τα παρακάτω αντιδραστήρια εκτός από το DNA και το ένζυμο Taq DNA Polymerase (ως παράδειγμα αναφέρονται οι συνθήκες για τον TRE-RFP μν, όπου ενισχύεται ένα τμήμα του RFP)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	x1 (μl)
dH₂O	15,7
dNTPs (2.5mM)	0,5
primer forward (10mM)	0,5
primer reverse (10mM)	0,5
10x Taq Buffer	2
Taq DNA Polymerase(5u/μl)	0,3
cDNA	0,5
Σύνολο	20

2. Σε κάθε σωληνάκι 0,5 ml erpendorf προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα δείγματος DNA
3. Διαμοιράζονται από 19,2 μl από το mastermix στα erpendorfs στα οποία θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση PCR
4. Προστίθεται το ένζυμο Taq DNA Polymerase
5. Τα δείγματα τοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή, όπου πραγματοποιείται η PCR αντίδραση. Οι συνθήκες της PCR αντίδρασης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

1) Επώαση στους 95° C για 10 λεπτά	
2) Επώαση στους 95° C για 40 λεπτά	29 κύκλοι
3) Επώαση στους 59° C για 40 λεπτά	
4) Επώαση στους 72° C για 40 λεπτά	
5) Επώαση στους 72° C για 5 λεπτά	
6) Επώαση στους 10° C	

Το προϊόν που ενισχύεται μετά από την PCR αντίδραση ελέγχεται σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%. Θεωρείται ενισχυμένο το γονίδιο που μας ενδιαφέρει όταν στο πήκτωμα εμφανιστεί μια ζώνη με το επιθυμητό μέγεθος του προϊόντος (εκφρασμένο σε ζεύγη βάσεων, bp)

Για τη δημιουργία του πηκτώματος αγαρόζης ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

1. 200ml 1xTAE και 1,6gr αγαρόζης θερμαίνονται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι βρασμού ώστε να λιώσει η αγαρόζη
2. Ψύχεται το μίγμα κάτω από τη βρύση μέχρι να αποκτήσει θερμοκρασία περίπου 50° C
3. Προσθήκη στο μίγμα 8ml Βρωμιούχου Αιθιδίου 1% (EtBr) και ανάδευση, ώστε το μίγμα να είναι ομοιογενές. Το Βρωμιούχο Αιθίδιο παρεμβάλλεται στο δίκλωνο DNA και φθορίζει κάτω από το υπεριώδες φως (UV light)
4. Το μίγμα μεταφέρεται στην κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου έχουν ήδη τοποθετηθεί οι χτένες για να δημιουργηθούν οι θέσεις ηλεκτροφόρησης (wells), στις οποίες θα μεταφερθούν τα δείγματα. Το πήκτωμα στερεοποιείται
5. Μόλις στερεοποιηθεί το πήκτωμα, αφαιρούνται με προσοχή οι χτένες και πληρούται η συσκευή ηλεκτροφόρησης με το διάλυμα 1xTAE
6. Τα δείγματα των προϊόντων της PCR αντίδρασης, μετά την προσθήκη 4μl διαλύματος φόρτωσης (6x loading dye), μεταφέρονται στις θέσεις ηλεκτροφόρησης του πηκτώματος αγαρόζης. Ως DNA ladder χρησιμοποιείται ο 100bp ladder

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 80-100 V για 20 λεπτά περίπου. Το DNA, όντας αρνητικά φορτισμένο, κινείται στο πήκτωμα από τον αρνητικό πόλο προς το θετικό. Το πήκτωμα,

μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης μεταφέρεται σε συσκευή που είναι εξοπλισμένη με υπεριώδες φως, στην οποία γίνεται η λήψη του αποτελέσματος.

4.7. Απομόνωση RNA – cDNA σύνθεση - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Η απομόνωση ολικού RNA πραγματοποιείται με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIZOL (TRI Reagent), το οποίο είναι κατάλληλο για την απομόνωση ολικού RNA από δείγματα ανθρώπινου, ζωικού και φυτικού ιστού, βακτηριακών κυττάρων και κυττάρων ζύμης. Το TRI Reagent συνδυάζει τη δράση της φαινόλης με θειοκυανική γουανιδίνη σε ένα μονοφασικό διάλυμα για τη λύση των κυττάρων και των πυρήνων τους και την ταυτόχρονη προστασία του RNA από τη δράση των RNασων. Η διαδικασία της απομόνωσης γίνεται ακολουθώντας αυστηρά άσηπτες συνθήκες και με χρήση αποστειρωμένων υλικών (RNase/DNase free dH₂O, erpendorfs, ρύγχη, πιπέτας), ώστε να εξαλειφθεί ο κίνδυνος επιμολύνσεων των δειγμάτων και δράσης των RNασων. Το πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Προσθήκη 1 ml αντιδραστηρίου TRIZOL σε κάθε δείγμα ιστού (οι ιστοί, είτε επεξεργάζονται αμέσως μετά τη λήψη, είτε μετά από ταχεία ψύξη με υγρό άζωτο και αποθήκευση στους -80°C μέχρι την απομόνωση του RNA)
2. Με τη χρήση ομογενοποιητή (Polytron PT1600E), διαλύεται ο ιστός ώστε να προκύψει ένα ομοιογενές μείγμα
3. Εφόσον ολοκληρωθεί η λύση των κυττάρων σε όλα τα δείγματα, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 10 λεπτά στους 4-8°C. Τα αδιάλυτα μόρια, όπως πρωτεΐνες, λίπη, πολυσακχαρίτες και κυτταρικά στοιχεία καθιζάνουν, ενώ το RNA παραμένει στο υπερκείμενο διάλυμα
4. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο αποστειρωμένο erpendorf των 2 ml και επώαση για 5 λεπτά στους 15-20°C
5. Προσθήκη 200 μl χλωροφόρμιου (CHCl₃) σε κάθε δείγμα

6. Γρήγορη ανακίνηση των δειγμάτων για 15 δευτερόλεπτα και επώαση για 2-3 λεπτά στους 15-20°C
7. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 12.000 στροφές για 15 λεπτά στους 4-8°C. Από τη φυγοκέντρηση προκύπτουν 3 στιβάδες: η κατώτερη στιβάδα περιέχει τους οργανικούς διαλύτες (φαινόλη-χλωροφόρμιο) όπου είναι διαλυμένες οι αναδιαταγμένες πρωτεΐνες και τα κυτταρικά υπολείμματα, η μεσαία στιβάδα είναι πολύ λεπτή, άσπρου χρώματος και περιέχει τα αδιάσπαστα κυτταρικά υπολείμματα και η ανώτερη υδάτινη στιβάδα είναι άχρωμη και περιέχει το RNA
8. Μεταφορά 500 μl από την υδάτινη στιβάδα που περιέχει το RNA σε ένα νέο αποστειρωμένο erpendorf των 2 ml
9. Προσθήκη ίσης ποσότητας κρύας ισοπροπανόλης [(CH₃)₂CHOH] σε κάθε ένα από τα παραπάνω δείγματα, ανάδευση των δειγμάτων και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
10. φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 12.000 στροφές για 15 λεπτά στους 4-8°C
11. Το RNA καθιζάνει στον πυθμένα, ενώ τα υπόλοιπα κυτταρικά στοιχεία που δεν απομακρύνθηκαν από την προηγούμενη φυγοκέντρηση, βρίσκονται στο υπερκείμενο διάλυμα. Απόρριψη του υπερκειμένου
12. Προσθήκη 1 ml διαλύματος 75% κρύας αιθανόλης, ανάδευση των δειγμάτων και φυγοκέντρηση στις 8.500 στροφές για 10 λεπτά στους 4-8°C
13. Απόρριψη του υπερκειμένου και φυγοκέντρηση υπό κενό αέρος για να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης
14. Προσθήκη 15 μl RNase/DNase free H₂O και τοποθέτηση των δειγμάτων για 10 λεπτά στους 57°C, ώστε να επαναιωρηθεί το RNA
15. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C

Για να αποφευχθεί η επιμόλυνση ή πρόσμιξη του RNA με οποιοδήποτε ίχνος δεοξυριβονουκλεοτιδικών μορίων, προηγείται της διαδικασίας σύνθεσης του cDNA, η επώαση με το ένζυμο DNase I. Το ένζυμο αυτό είναι μια ενδονουκλεάση που αναγνωρίζει

και διασπά μονόκλινα και δίκλινα μόρια DNA, αφήνοντας ελεύθερα 3'-OH άκρα. Το πρωτόκολλο έχει ως εξής (τα αντιδραστήρια ελήφθησαν από την εταιρία Promega) :

1. Μεταφορά 1 µg RNA από κάθε δείγμα σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο eppendorf και προσθήκη RNase/DNase free H₂O μέχρι τα 9 µl
2. Προσθήκη 1µl από το ένζυμο RQ1 RNase free DNase I (1U/µg)
3. Προσθήκη 1µl διαλύματος RQ1 10x buffer
4. Επώαση των δειγμάτων στους 37°C για 30 λεπτά
5. Απενεργοποίηση του ενζύμου DNase I με την προσθήκη 1µl διαλύματος τερματισμού (RQ1 stop solution)
6. Επώαση των δειγμάτων στους 65°C για 10 λεπτά

Η αντίστροφη μεταγραφή είναι μία τεχνική κατά την οποία το RNA μεταγράφεται σε cDNA, με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (190). Στην αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο M-MuLV αντίστροφη μεταγραφάση (Promega). Για όλα τα δείγματα δημιουργήθηκαν και δείγματα ελέγχου από τα οποία απουσίαζε η αντίστροφη μεταγραφάση. Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή, ως εξής:

1. Προσθήκη 1µl από το μίγμα των τυχαίων εκκινήτων (random primers) σε 11 µl δείγματος, που προέκυψαν από την επίδραση της DNase I στα αρχικά δείγματα RNA
2. Επώαση των δειγμάτων στους 70°C για 5 λεπτά
3. Διακοπή της αντίδρασης στους 4°C
4. Προετοιμασία του mastermix στο οποίο περιέχονται τα παρακάτω αντιδραστήρια εκτός του RNA. Στα δείγματα μάρτυρες αντικαταστάθηκε η ποσότητα της αντίστροφης μεταγραφάσης με 1 µl RNase/DNase free H₂O

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	x1 (μl)
RT buffer	5
dNTPs (2.5mM)	5
RNaseOUT	1
M-MLV RT	1
RNA	13
ΣΥΝΟΛΟ	25

5. Σε κάθε eppendorf προστέθηκε ποσότητα RNA του κατάλληλου δείγματος
6. Μεταφορά 12μl από το mastermix στα σωληνάρια eppendorfs στα οποία θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής
7. Επώαση των δειγμάτων στους 37°C για 60 λεπτά
8. Τερματισμός της αντίδρασης στους 4°C
9. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C

Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου είναι μια ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος ποσοτικοποίησης της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο mRNA. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR με φθορίζοντα μόρια και στη μέτρηση της εκπομπής του παραγόμενου φθορισμού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, χωρίς να διακόπτεται ή να αφαιρείται κάποιο κλάσμα της (191). Η ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης στην παρούσα μελέτη έγινε με τη χρήση της ειδικής φθορίζουσας ουσίας SYBR Green I (Invitrogen). Η χρωστική SYBR Green I είναι κατασκευασμένη με τέτοιο τρόπο ώστε να μην παρεμποδίζει την πορεία της αντίδρασης. Έτσι, μετά την αποδιάταξη του δίκλωνου cDNA και τον υβριδισμό των εκκινητών, η χρωστική παραμένει ελεύθερη και δεν εκπέμπεται σήμα φθορισμού. Στη φάση του πολυμερισμού, τα μόρια της χρωστικής προσδένονται στους νεοσυντιθέμενους κλώνους και εκπέμπουν φθορισμό. Έτσι, η αύξηση της παραγωγής θυγατρικών μορίων οδηγεί σε αύξηση της έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ποσοτική ανίχνευση της συγκέντρωσης των ελεγχόμενων γονιδίου, καθώς όσο μεγαλύτερη είναι, τόσο λιγότεροι κύκλοι απαιτούνται ώστε να ξεπεραστεί το κατώφλι ευαισθησίας και να ανιχνευτεί το φθορίζον σήμα.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης. Στο σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό, για το ίδιο δείγμα προσδιορίζεται η ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου σε σχέση με την ποσότητα ενός γονιδίου αναφοράς (housekeeping gene), ως προς το οποίο κανονικοποιείται η έκφραση της αλληλουχίας-στόχου. Υπάρχουν πολλές μαθηματικές προσεγγίσεις για τη σχετική ποσοτικοποίηση. Στο σχετικό προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων της παρούσας μελέτης, εφαρμόστηκε η μέθοδος 2- $\Delta\Delta C_T$ ή μέθοδος σύγκρισης των C_T ($\Delta\Delta C_T$) (comparative C_T method). Η τιμή C_T (Threshold cycle) αντιστοιχεί στον κύκλο εκείνο, στον οποίο η εκπομπή φθορισμού είναι μεγαλύτερη από το φθορισμό λόγω «θορύβου» (background). Συγκεκριμένα, με αυτήν τη μέθοδο υπολογίζονται οι παράμετροι:

$$\begin{aligned} \Delta C_{T\text{δείγματος}} &= C_{T\text{δείγματος, γονιδίου-στόχου}} - C_{T\text{δείγματος, γονιδίου-αναφοράς}} \\ \Delta C_{T\text{βαθμονομητή}} &= C_{T\text{βαθμονομητή, γονιδίου-στόχου}} - C_{T\text{βαθμονομητή, γονιδίου-αναφοράς}} \\ \Delta\Delta C_T &= \Delta C_{T\text{δείγματος}} - \Delta C_{T\text{βαθμονομητή}} \end{aligned}$$

Στη συνέχεια, υπολογίζεται η τιμή $2^{-\Delta\Delta C_T}$, που αντιστοιχεί στην κανονικοποιημένη ποσότητα του γονιδίου-στόχου, τόσο ως προς τον εσωτερικό μάρτυρα (γονίδιο-αναφοράς), όσο και ως προς ένα δείγμα που ορίζεται ως βαθμονομητής. Ως βαθμονομητής ορίζεται, συνήθως, ένα δείγμα στο οποίο εκφράζονται σταθερά, τόσο τα γονίδια-στόχος όσο και τα γονίδια-αναφοράς.

Στην ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο-αναφοράς το γονίδιο *Gardh*. Το πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Προετοιμασία του mastermix στο οποίο περιέχονται όλα τα παρακάτω αντιδραστήρια εκτός από το cDNA

ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	x1 (μl)
SYBR Green SuperMix	10
primer forward (10mM)	0,5
primer reverse (10mM)	0,5
dH ₂ O	7
cDNA	2
Συνολο	20

2. Προσθήκη της ποσότητας cDNA του κατάλληλου δείγματος σε σωληνάκι erpendorf
3. Μεταφορά 18 μl από το mastermix στα erpendorfs, στα οποία θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση της qRT-PCR
4. Τα δείγματα τοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου, όπου πραγματοποιείται η qRT-PCR αντίδραση. Οι συνθήκες της qRT-PCR (ενδεικτικά για το γονίδιο Gardh), αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα

1) Επώαση στους 52° C για 2 λεπτά	49 κύκλοι
2) Επώαση στους 95° C για 2 λεπτά	
3) Επώαση στους 95° C για 15 λεπτά	
4) Επώαση στους 58° C για 40 λεπτό	
5) Επώαση στους 58° C για 10 λεπτά	
6) Επώαση στους 0,5° C	

4.8. Ανοσοσύπωμα κατά Western

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπό μελέτη πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (Ανοσοσύπωμα) κατά Western (192, 193). Η μέθοδος περιλαμβάνει την έκλυση των πρωτεϊνών από το υπό μελέτη δείγμα, την ποσοτικοποίησή τους, την ηλεκτροφόρησή τους σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, την ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο πήκτωμα διαχωρισμού σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και την ανοσοδοκιμασία κατά Western. Αναλυτικότερα έχουμε:

1. Στο υπό μελέτη δείγμα προστίθεται κατάλληλος όγκος διαλύματος λύσης, στο οποίο προστέθηκαν οι αναστολείς πρωτεασών: 200 μM λευπεπτίνη (leupeptin), 5 mM DTT, 300 μM PMSF και 10 μM trans-epoxy-succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane (E 64)
2. Τα προϊόντα της λύσης συλλέγονται μαζί με το διάλυμα λύσης σε σωλήνα τύπου erpendorf, αναδεύονται ισχυρά και επωάζονται για 30 λεπτά (στον πάγο ή στους -80°C) και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται (13.000 στροφές, 4°C, 10 λεπτά)

3. Στο υπερκείμενο κάθε δείγματος (που αποτελεί και το πρωτεϊνικό κλάσμα) όγκου V προστίθεται 0.33V διαλύματος κατεργασίας των δειγμάτων (*sample buffer*, 4X)
4. Τα δείγματα βράζονται για 3 λεπτά και φυλάσσονται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που περιέχεται στα υπό ανάλυση δείγματα, προσδιορίζεται με τη χρωματομετρική μέθοδο Bradford (194). Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, να συνδέεται με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον, μεταβάλλοντας το χρώμα της. Η ελεύθερη χρωστική έχει μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής, στα 595 nm.

Απαραίτητη είναι η δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η οποία προκύπτει από τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (O.D.) γνωστών συγκεντρώσεων προτύπων διαλυμάτων αλβουμίνης από Βόειο ορό (Bovine Serum Albumin, BSA, 1 mg/ml σε απιονισμένο H_2O). Συγκρίνοντας την O.D. του δείγματος, μετά από κατάλληλη αραιώση (20 έως 200 φορές), με την οπτική απορρόφηση των προτύπων, προκύπτει η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο δείγμα μας. Αναλυτικά:

1. Γνωστές ποσότητες πρότυπης πρωτεΐνης BSA (2 μg , 4 μg , 8 μg , 12 μg , 16 μg και 20 μg) αντιδρούν με το αντιδραστήριο Bradford [αραιωμένο 1:5 (v/v) με απιονισμένο H_2O] (Bio-Rad) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
2. Ταυτόχρονα, με το αντιδραστήριο αντιδρά και συγκεκριμένος όγκος από το δείγμα (επιλέγεται ο κατάλληλος όγκος ανάλογα με την προέλευση των πρωτεϊνών, ώστε η τιμή της απορρόφησης να βρίσκεται μέσα στην πρότυπη καμπύλη)
3. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τον όγκο του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε, υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης

Επειδή οι ακριβείς τιμές της απορρόφησης επηρεάζονται από το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την παρασκευή της χρωστικής μέχρι τη χρήση της, η πρότυπη καμπύλη πρέπει να κατασκευάζεται σε κάθε μέτρηση

Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών που περιέχονται στα διάφορα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης, που βασίζεται στο ότι οι πρωτεΐνες σε διαφορετικό pH από

το ισοηλεκτρικό τους σημείο, μετακινούνται υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το αλκαλικό, ασυνεχές σύστημα SDS-ηλεκτροφόρησης, σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (195). Στα υπό ανάλυση δείγματα προστίθεται το διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων (*sample buffer*), το οποίο όπως ήδη αναφέρθηκε περιέχει: i) μερκαπτοαιθανόλη, η οποία δημιουργεί αποδιατακτικές συνθήκες (αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών), ii) SDS, το οποίο προσδίδει αρνητικό φορτίο σε όλες τις πρωτεΐνες, iii) γλυκερόλη, η οποία βοηθάει στην τοποθέτηση του δείγματος στην πηκτή και iv) κυανούν της βρωμοφαινόλης, το οποίο επίσης βοηθάει στην τοποθέτηση του δείγματος στην πηκτή, αλλά και στην παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Το αποτέλεσμα είναι οι πρωτεΐνες των δειγμάτων να αποκτούν τυχαία διαμόρφωση (αποδιατάσσονται) και αρνητικό φορτίο, οπότε ο διαχωρισμός τους πραγματοποιείται αποκλειστικά με βάση το μοριακό τους βάρος, δηλαδή πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους κινούνται ταχύτερα κατά μήκος της πηκτής σε σχέση με πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους (196, 197).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, όπου το πήκτωμα σχηματίζεται ανάμεσα σε δυο κάθετες πλάκες (επίπεδη πηκτή, slab gel). Η πηκτή σχηματίζεται μετά από πολυμερισμό των μονομερών του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), που συνδέονται μεταξύ τους με μόρια N,N-μεθυλενο-δισακρυλαμιδίου (ή bis ακρυλαμίδιο, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται παρουσία υπερθειικού αμμωνίου (APS) και N,N,N',N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TEMED). Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου και του bis ακρυλαμιδίου. Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών των δειγμάτων, χρησιμοποιείται πηκτή (*separating gel*) με συγκέντρωση ακρυλαμίδης από 10% (w/v) έως 15% (w/v), ανάλογα με τη μοριακή μάζα της εξεταζόμενης πρωτεΐνης. Πριν την είσοδό τους στην πηκτή διαχωρισμού, οι πρωτεΐνες «διασχίζουν» την πηκτή επιστοίβαξης (*stacking gel*), η οποία έχει διαφορετική συγκέντρωση ακρυλαμίδης [5% (w/v)] και διαφορετικό pH, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη και ομοιόμορφη είσοδο των πρωτεϊνών στην πηκτή διαχωρισμού.

Παράλληλα με τα δείγματα, ηλεκτροφορείται και μίγμα πρωτεϊνών γνωστής μοριακής μάζας (*protein markers*), που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της πορείας της

ηλεκτροφόρησης και για την καλύτερη αναγνώριση μιας πρωτεΐνης άγνωστης μοριακής μάζας. Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται παρακάτω:

1. Οι γυάλινες πλάκες καθαρίζονται με μεθανόλη και τοποθετούνται σε κατάλληλη συσκευή στήριξης
2. Το διάλυμα που θα σχηματίσει την πηκτή διαχωρισμού τοποθετείται ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες. Η σύστασή του είναι: 375 mM Tris/HCl pH 8.8, 10% έως 15% (w/v) ακρυλαμίδιο, 0.275% έως 0.4125% (w/v) bis ακρυλαμίδιο, 0.1% (w/v) SDS, 0.15% (w/v) APS και 0.07% (v/v) TEMED
3. Πριν πολυμεριστεί, προστίθεται στην κορυφή του μια στοιβάδα απιονισμένο νερό, ώστε να ευθυγραμμιστεί η επιφάνειά του
4. Μετά τον πολυμερισμό, αφαιρείται το επιπλέον νερό από την επιφάνεια του πηκτώματος και προστίθεται το διάλυμα του πηκτώματος επιστοιβάξης, το οποίο περιέχει: 125 mM Tris/HCl pH 6.8, 5% (w/v) ακρυλαμίδιο, 0.165% (w/v) bis ακρυλαμίδιο, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS και 0.07% (v/v) TEMED. Παράλληλα, τοποθετείται ειδική «χτένα» για το σχηματισμό των θέσεων που θα τοποθετηθούν τα δείγματα
5. Οι πλάκες με το πήκτωμα τοποθετούνται στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης, η οποία γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (*running buffer*)
6. Τα δείγματα βράζονται στους 100°C για 3 λεπτά, αναδεύονται και φορτώνονται με τη βοήθεια μικροσύριγγας και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 160 V
7. Η πορεία της ηλεκτροφόρησης παρακολουθείται με τη βοήθεια της χρωστικής που περιέχεται στο διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων και τερματίζεται όταν η χρωστική φτάσει στο τέλος του πηκτώματος

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο πήκτωμα διαχωρισμού σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όπου αποτυπώνονται όπως ακριβώς έχουν διαχωριστεί στην ηλεκτροφόρηση SDS (198, 199).

Συγκεκριμένα :

1. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα, η νιτροκυτταρίνη, αλλά και 8 χαρτιά Whatman N^ο 3, που έχουν τις διαστάσεις του πηκτώματος, διαβρέχονται με διάλυμα μεταφοράς για 15 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση
2. Το πήκτωμα, η νιτροκυτταρίνη και τα χαρτιά Whatman τοποθετούνται στη συσκευή μεταφοράς, ανάμεσα στους δυο πόλους, με την εξής διάταξη από την άνοδο προς την κάθοδο: 4 χαρτιά Whatman-νιτροκυτταρίνη-πήκτωμα-4 χαρτιά Whatman. Η τοποθέτηση γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται η παγίδευση φυσαλίδων. Η μέθοδος βασίζεται στο ότι οι πρωτεΐνες, που είναι αρνητικά φορτισμένες λόγω του SDS, κινούνται από τον αρνητικό πόλο προς το θετικό πόλο της συσκευής
3. Εφαρμόζεται τάση, έτσι ώστε από κάθε νιτροκυτταρίνη να διέρχεται ρεύμα έντασης 400 mA και η μεταφορά ολοκληρώνεται σε 120 λεπτά

Με τη μέθοδο της ανοσοδοκιμασίας κατά Western, μπορεί να γίνει εντοπισμός μιας πρωτεΐνης-στόχου, επάνω στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος (199). Η ανίχνευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών έγινε έμμεσα, δηλαδή αρχικά ένα ειδικό αντίσωμα (πρωτογενές αντίσωμα) προσδέθηκε σε αυτές επάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια ένα δεύτερο αντίσωμα (δευτερογενές αντίσωμα), συζευγμένο με ένα ένζυμο, αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, έγινε μέσω του εντοπισμού του δευτερογενούς αντισώματος, με κατάλληλη μέθοδο όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση, είναι αυτή της ενισχυμένης χημιοφωταύγειας (ECL-Enhanced Chemiluminescence).

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο φαινόμενο της φωταύγειας, δηλαδή στην εκπομπή φωτός (ακτινοβολίας) από ένα μόριο, καθώς αυτό χάνει ενέργεια κατά τη μετάπτωσή του από τη διεγερμένη κατάσταση στη βασική. Ένα γνωστό σύστημα για την παραγωγή χημιοφωταύγειας είναι αυτό της υπεροξειδάσης της αγριοραφανίδας (Horse Radish Peroxidase, HRP), που καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης σε αλκαλικές συνθήκες. Αμέσως μετά την οξείδωσή της, η λουμινόλη βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση και κατόπιν μεταπίπτει σε βασική μέσω της εκπομπής φωτός. Κατά την ενισχυμένη χημιοφωταύγεια, η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία χημικών ενισχυτών (όπως οι φαινόλες) (200).

Η διαδικασία που ακολουθείται στην ανάλυση κατά Western είναι η ακόλουθη:

1. Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης για μία ώρα (θερμοκρασία δωματίου) με διάλυμα δέσμησης μη-ειδικών θέσεων [5% (w/v) σκόνη γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά σε διάλυμα έκπλυσης TBS-T (Tris-buffered saline-Tween-20) το οποίο περιέχει: 20 mM Tris/HCl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20
2. Πλύση της μεμβράνης (4 x 5 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση) σε 5% (w/v) σκόνη γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά σε διάλυμα έκπλυσης TBS-T
3. Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης για 16-18 ώρες με κατάλληλο αντίσωμα, το οποίο είναι αραιωμένο σε διάλυμα 5% BSA ή σκόνη γάλακτος (w/v) σε TBS-T, στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση
4. Εκπλύσεις της μεμβράνης (4 x 5 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση) με διάλυμα TBS-T
5. Επώαση της μεμβράνης με δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει το πρώτο και είναι αραιωμένο σε διάλυμα 1% (w/v) σκόνης γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά σε TBS-T, για μία ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν (anti-rabbit ή anti-mouse, ανάλογα με το πρώτο αντίσωμα) είναι συζευγμένα με το ένζυμο της υπεροξειδάσης (HRP)
6. Πλύση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (4 x 5 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση) με διάλυμα έκπλυσης TBS-T
7. Εφαρμογή της μεθόδου της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Η ομάδα αντιδραστηρίων του ECL (RPN 2106, Amersham International) περιλαμβάνει δύο αντιδραστήρια. Το A, μέσα στο οποίο βρίσκεται το υπεροξείδιο το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα για το ένζυμο ιχνηθέτη που βρίσκεται συζευγμένο στο δευτερογενές αντίσωμα και το B, που περιέχει λουμινόλη και ενισχυτή της χημειοφωταύγειας. Τα αντιδραστήρια αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1 λίγο πριν τη χρήση και ακολουθεί επώαση της μεμβράνης για 2 λεπτά υπό ανάδευση
8. Επικάλυψη της μεμβράνης με ζελατίνη και έκθεσή της σε κατάλληλο φιλμ, μέσα σε ειδική κασέτα. Ο χρόνος έκθεσης εξαρτάται από την υπό μελέτη πρωτεΐνη (την

ποσότητά της στο κυτταρικό εκχύλισμα και την αλληλεπίδρασή της με το πρωτογενές αντίσωμα)

9. Εμφάνιση του φιλμ (επώαση σε διάλυμα εμφανιστή, developer) και σταθεροποίηση του σήματος (επώαση σε διάλυμα σταθεροποιητή, fixer)

Μια διαδικασία ιδιαίτερα χρήσιμη στην περίπτωση όπου χρειάζεται να ελεγχθεί το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι μιας πρωτεΐνης μάρτυρα ή στην περίπτωση που τα συγκεκριμένα δείγματα είναι σπάνια και δεν υπάρχει η δυνατότητα για παρασκευή πολλών μεμβρανών, αποτελεί η αφαίρεση κάποιου αντισώματος από την νιτροκυτταρίνη (stripping) (201, 202). Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι δυνατόν να αφαιρεθεί το αντίσωμα, και αφού απομακρυνθούν πλήρως οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την παραπάνω διαδικασία, μπορεί να ακολουθήσει επώαση με διαφορετικό πρωτογενές αντίσωμα. Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Επώαση της μεμβράνης στους 55°C, για μία ώρα υπό συνεχή ανάδευση, σε διάλυμα αποκόλλησης των αντισωμάτων
2. Τέσσερις πεντάλεπτες εκπλύσεις με TBS-T, υπό συνεχή ανάδευση
3. Επώαση με το νέο πρωτογενές αντίσωμα, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως

Μετά τη μεταφορά, προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχής μεταφορά και το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών μεταξύ των δειγμάτων, η νιτροκυτταρίνη βάφεται με διάλυμα της χρωστικής Ponceau S. Με τη χρήση αυτής της χρωστικής χρωματίζονται τα πολυπεπίδια, που έχουν μεταφερθεί ηλεκτροφορητικά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Συγκεκριμένα:

1. Η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης επωάζεται με το διάλυμα της χρωστικής [0.4% (w/v) Ponceau S σε 7.5% (w/v) τριχλωροοξικού οξέος (TCA)] για 1 έως 2 λεπτά, υπό ανάδευση
2. Αποχρωματισμός της μεμβράνης με εκπλύσεις με διάλυμα TBS-T

4.9. Ιστολογία-Ανοσοφθορισμός

Για την ιστολογική ανάλυση των πνευμόνων πραγματοποιείται εμποτισμός αυτών μετά απο ενδοτραχειακή έγχυση μίγματος 4% παραφορμαλδεΐδης/ διαλύματος έγκλεισης OCT (2:1 v/v) και περίσφιξη της τραχείας ώστε να παραμείνει εντός του πνεύμονα το υλικό μονιμοποίησης. Ακολουθεί εμβάπτιση όλου του ιστού σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης και επώαση όλη τη νύχτα στους 4°C. Ο ιστός ξεπλένεται με PBS και μεταφέρεται σε διάλυμα 30% σουκρόζης σε PBS, όπου και επώάζεται όλη τη νύχτα στους 4°C. Ακολουθούν νέες εκπλύσεις με PBS και έγκλειση σε διάλυμα OCT, σε ξηρό πάγο. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C. Για την ιστολογική ανάλυση του ήπατος και των υπόλοιπων οργάνων, εφαρμόζεται η ίδια διαδικασία όπως και στην επεξεργασία του πνεύμονα, εκτός από την εκ των έσω μονιμοποίηση με το μίγμα 4% παραφορμαλδεΐδης/ διαλύματος έγκλεισης OCT.

Με τη χρήση κρουστάτη (Leica CM1950), ελήφθησαν για όλα τα υπό μελέτη όργανα, 10μm τομές, οι οποίες και μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες επικαλυμμένες με πολυλυσίνη, επιτρέποντας έτσι την ισχυρή πρόσδεση των τομών πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι πλάκες αποθηκεύτηκαν για μελλοντική χρήση στους -20° C.

Για το χαρακτηρισμό του προτύπου έκφρασης και της σχετικής κατανομής των κυττάρων που εκφράζουν eGFP και mRFP στους υπό μελέτη ιστούς, καθώς επίσης και για το χαρακτηρισμό του τύπου αυτών των κυττάρων, χρησιμοποιείται η τεχνική του ανοσοφθορισμού, κατά την οποία ανιχνεύονται με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων, οι παραπάνω κυτταρικοί τύποι.

Συγκεκριμένα το πρωτόκολλο έχει ως εξής:

1. Επιλογή των τομών και επαναφορά της θερμοκρασίας και υγρασίας σε συνθήκες δωματίου
2. Μονιμοποίηση των τομών με επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με διάλυμα 4% παραφορμαλδεΐδης
3. 3x5 λεπτά πλύσεις με PBS υπό ήπια ανάδευση
4. Αντιγονική ανάκτηση-ανάταξη με επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM κιτρικού νατρίου, pH: 6.0 για 30 λεπτά, σε υδατόλουτρο, στους 80° C. Με τη διαδικασία αυτή,

αποκαλύπτονται οι αντιγονικοί επίτοποι που δεν ήταν προσπελάσιμοι στο αντίσωμα, λόγω της πρότερης επεξεργασίας του ιστού και της δημιουργίας ενδο-πρωτεϊνικών δεσμών στο ιστικό δείγμα

5. Επώαση για 30 λεπτά σε πάγο ώστε να επανέλθει η θερμοκρασία του δείγματος, σε αυτήν του δωματίου
6. 3x5 λεπτά πλύσεις με PBS υπό ήπια ανάδευση
7. Επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με διάλυμα δέσμησης μη-ειδικών θέσεων (2% φυσιολογικός ορός της ίδιας ζωικής προέλευσης με αυτήν από την οποία προέρχεται το δευτερογενές αντίσωμα, διαλυμένο σε PBS-0,2%(v/v)TritonX100)
8. Ολονύκτια επώαση στους 4° C με κατάλληλη αραίωση του πρωτογενούς αντισώματος, έναντι του υπό μελέτη αντιγονικού επιτόπου, διαλυμένου σε διάλυμα δέσμησης μη-ειδικών θέσεων
9. 3x10 λεπτά πλύσεις με PBS υπό ήπια ανάδευση
10. Επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με κατάλληλη αραίωση του σημασμένου με φθοριόχρωμα-πρωτογενούς αντισώματος, έναντι του πρώτου αντισώματος, διαλυμένου σε διάλυμα δέσμησης μη-ειδικών θέσεων
11. 3x10 λεπτά πλύσεις με PBS υπό ήπια ανάδευση
12. Επώαση με DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το DAPI είναι ένα φθορίζον μόριο που προσκολλάται ισχυρά στις A-T πλούσιες περιοχές του DNA και ανιχνεύεται ως μπλε φως, επιτρέποντας έτσι την ανίχνευση της χρωματίνης του κυτταρικού πυρήνα
13. Πλύση με PBS
14. Έγκλιση των τομών με τη χρήση διαλύματος έγκλισης (mounding medium) και επικάλυψη με καλυπτρίδα

Φωτογραφίες ανοσοφθορισμού ελήφθησαν με τη χρήση του Leica DMR2 μικροσκοπίου με DFC320 ψηφιακή κάμερα ή LEICA TCS-SP5 συνεστιακού μικροσκοπίου (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη φαίνονται στον Πίνακα 7.

4.10. Απομόνωση πνευμονοκυττάρων και ηπατοκυττάρων με ενζυμική πέψη

Για την απομόνωση των κυτταρικών πληθυσμών του πνεύμονα εφαρμόζεται το εξής πρωτόκολλο:

1. Αναισθητοποίηση του μυ με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση αναισθητικού κεταμίνης/ξυλαζίνης
2. Μόλις επιτευχθεί το κατάλληλο βάθος αναισθησίας, ακινητοποιείται ο μυς στο χειρουργικό πάγκο και καθαρίζεται η περιοχή της τομής με 70% EtOH
3. Αποκαλύπτεται η κοιλιακή περιοχή και κόβεται η κοιλιακή αορτή ώστε το πειραματόζωο να ευθανατωθεί λόγω αιμορραγίας
4. Προσεκτική αποκάλυψη του θώρακα, ώστε να μην τραυματιστεί ο πνεύμονας
5. Εμποτισμός από τη καρδιά 10 ml PBS με χρήση σύριγγας των 10 ml και βελόνας 23G, ώστε να απομακρυνθεί το αίμα από τους πνεύμονες
7. Ακολουθεί αφαίρεση των πνευμόνων και τοποθέτησή τους σε τρυβλίο petri
8. Τεμαχισμός των πνευμόνων σε πολύ μικρά τμήματα με χρήση χειρουργικής λαβίδας, ψαλιδιού και ξυραφιού
9. Μεταφορά των τεμαχισμένων τμημάτων του πνεύμονα σε σωλήνα falcon που περιέχει τα ένζυμα: Collagenase/Dispase, Elastase και Dnase σε PBS και επώασή τους για 1,5 ώρα στους 37°C σε κινούμενο κυκλικό αναδευτήρα, ώστε να επιτευχθεί η ενζυμική πέψη του πνεύμονα
10. Ανάδευση με πιπέτα του πνευμονικού ιστού ανά 15 λεπτά για να διευκολυνθεί η ενζυμική του πέψη

11. Εφόσον οι πνεύμονες μετατραπούν σε εναιώρημα μονών κυττάρων, το διάλυμα περνάει από ηθμό διαμέτρου 70 μm
12. Το εναιώρημα των κυττάρων του πνεύμονα φυγοκεντρείται στις 1200 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C
13. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 0,5 ml διαλύματος HBSS⁺⁺. Ακολουθεί προσδιορισμός του αριθμού και της βιωσιμότητας των απομονωμένων πνευμονοκυττάρων σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer, με χρώση με trypan blue

Για την απομόνωση των ηπατοκυττάρων εφαρμόζεται το εξής πρωτόκολλο:

1. Αναισθητοποίηση του μυ με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση αναισθητικού κεταμίνης/ξυλαζίνης
2. Αποκάλυψη της κοιλιακής περιοχής και εντοπισμός της πυλαίας φλέβας. Ακολουθεί γρήγορα η αποκάλυψη του θώρακα και ο εντοπισμός της κεντρικής φλέβας
3. Είσοδος με ατραυματική πλαστική κάνουλα 22G στην κεντρική φλέβα, μέσω της καρδιάς και έναρξη του εμποτισμού του ήπατος, με τη χρήση 40 ml προθερμασμένου (39°C) διαλύματος Liver Perfusion Medium (Girco). Με την έναρξη του εμποτισμού, αμέσως κόβεται η πυλαία φλέβα ώστε να λειτουργήσει ως οδός παροχέτευσης του υγρού που εμποτίζει το ήπαρ
4. Εφαρμογή με τη χρήση περισταλτικής αντλίας, ενός ρυθμού εμποτισμού 1 ml/min. Εμποτισμός για 20-25 λεπτά, όπου απομακρύνεται όλο το αίμα που κυκλοφορεί εντός των λοβών του ήπατος
5. Ακολουθεί εμποτισμός του ήπατος με 50ml προθερμασμένου (39°C) διαλύματος Liver Digest Medium (Gibco), εμπλουτισμένου με 250μl από 100mg/ml collagenase (Sigma-Aldrich Cat. No: C5138), με ρυθμό εμποτισμού 1 ml/min. Σε αυτό το στάδιο ο ηπατικός ιστός διασπάται γρήγορα
6. Απομόνωση του ήπατος και μεταφορά του σε τρυβλίο petri που περιέχει 1-2 ml Liver Digest Medium και κατάτμηση του ήπατος με τη χρήση λαβίδων. Προσθήκη 10-15 ml

διαλύματος Hepatocyte Wash Medium (Girco) εμπλουτισμένου με πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη

7. Μεταφορά του προϊόντος της πέψης από ηθμό 100 μm , σε τελικό όγκο 20ml Hepatocyte Wash Medium
8. Φυγοκέντρηση τρεις φορές σε 20ml Hepatocyte Wash Medium, στα 70g για τέσσερα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απόρριψη κάθε φορά του υπερκειμένου
9. Επαναιώρηση του ιζήματος των ηπατοκυττάρων σε ~5ml Hepatocyte Wash Medium και προσδιορισμός του αριθμού και της βιωσιμότητας των απομονωμένων ηπατοκυττάρων σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer, με χρώση με trypan blue

4.11. Ζωικά μοντέλα πνευμονικής βλάβης

Θηλυκοί, διπλά διαγονιδιακοί TRE-RFP/BRE-eGFP μύες, ηλικίας μεταξύ 12-16 εβδομάδων δέχθηκαν Ναφθαλένιο, Μπλεομυκίνη ή Οβαλβουμίνη, για την πρόκληση πνευμονικής ιστικής βλάβης. Στην περίπτωση της χορήγησης Ναφθαλενίου (203), προκαλείται ταχεία και μαζική βλάβη του βρογχικού επιθηλίου, λόγω του θανάτου των κυττάρων clara, ενώ στην περίπτωση της Μπλεομυκίνης (204), προκαλείται βλάβη του κυψελιδικού τμήματος του πνεύμονα και τελικά ίνωση, λόγω του θανάτου των τύπου I πνευμονοκυττάρων. Στην περίπτωση της χορήγησης οβαλβουμίνης, παρατηρείται εμφάνιση οξείας φλεγμονώδους αντίδρασης (205) με χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά του άσθματος.

Στο μοντέλο του Ναφθαλενίου, 300mg/kg Ναφθαλένιο (Sigma-Aldrich, 184500) διαλυμένο σε αραβοσιτέλαιο (διαλύτης) ή μόνο διαλύτης, χορηγήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση εφάπαξ. Οι πνεύμονες συνελέγησαν τις ημέρες 3 και 6 μετά τη χορήγηση του Ναφθαλενίου. Στο μοντέλο της Μπλεομυκίνης, Μπλεομυκίνη (Nippon Kayaku co ltd, Bleocin) διαλυμένη σε PBS (0.033 Units/mouse) ή μόνο PBS (διαλύτης) χορηγήθηκαν ενδοτραχειακά σε τελικό όγκο 30 μl . Οι πνεύμονες συλλέχθηκαν τις ημέρες 4 και 7 μετά τη χορήγηση της Μπλεομυκίνης. Στο μοντέλο της οβαλβουμίνης, πραγματοποιήθηκε ενδοπεριτοναϊκή ένεση 75 μg οβαλβουμίνης με ανοσοενισχυτικό Alum τις ημέρες 0 και 7, ώστε να επιτευχθεί η πρώτη και η δεύτερη ανοσοποίηση των πειραματόζων αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τις ημέρες 14, 15

και 16 χορηγήθηκε, στην ομάδα ελέγχου νεφέλωμα οβαλβουμίνης 5% w/v για 30 λεπτά, ενώ στην ομάδα-μάρτυρα χορηγήθηκε νεφέλωμα PBS για 30 λεπτά αντίστοιχα. Οι πνεύμονες συνελέγησαν 24 ώρες μετά την τελευταία ευαισθητοποίηση.

4.12. Ζωικά μοντέλα ηπατικής βλάβης

Θηλυκοί, διπλά διαγονιδιακοί TRE-RFP/BRE-eGFP μύες, υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση των 2/3 του ηπατικού ιστού (206), η οποία προκαλεί αρχικά οξεία ηπατική βλάβη συνοδευόμενη από άμεση ενεργοποίηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των ηπατοκυττάρων και πλήρη αναπλήρωση του ιστού εντός ενός μηνός μετά την επέμβαση. Ο ηπατικός ιστός αναλύθηκε 2 και 7 ημέρες μετά τη χειρουργική επέμβαση, στη φάση της ηπατικής βλάβης και ανάκαμψης. Επίσης, διπλά διαγονιδιακοί TRE-RFP/BRE-eGFP μύες, υποβλήθηκαν σε αποχή από την τροφή για 24 ώρες (207). Η μεταβολή αυτή οδηγεί σε προσαρμογή όλων των μεταβολικών διεργασιών του ήπατος, σε μια προσπάθεια να ανταποκριθεί στις ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού. Τέλος, διαγονιδιακοί TRE-RFP μύες ενέθηκαν ενδοφλέβια με 15μg Κονκαναβαλίνης A ανά 1mg σωματικού βάρους. Η Κονκαναβαλίνη A είναι μια λεκτίνη που προσκολλάται στη μεμβράνη των ηπατοκυττάρων και ενεργοποιεί την ανοσοεπαγόμενη ηπατική ανεπάρκεια (208), με ταυτόχρονη αύξηση της απόπτωσης και του πολλαπλασιασμού των ηπατοκυττάρων. Κονκαναβαλίνη A (Sigma-Aldrich, C2010) διαλυμένη σε PBS (διαλύτης) ή μόνο διαλύτης, χορηγήθηκαν με ενδοφλέβια ένεση εφάπαξ. Ο ηπατικός ιστός αναλύθηκε 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση.

4.13. Δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών

Για τη δημιουργία των cDNA βιβλιοθηκών από τα απομονωμένα -με κυτταροδιαχωρισμό- ηπατοκύτταρα που προήλθαν από τους TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακούς μύες, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται απομόνωση ολικού RNA από τα απομονωμένα ηπατοκύτταρα ως εξής:

1. Φυγοκέντρηση των ηπατοκυττάρων σε 70g για 5 λεπτά
2. Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 75μl διαλύματος RLT, εμπλουτισμένου με 0,143 M β-μερκαπτοαιθανόλη. Το διάλυμα RLP προέρχεται από την εμπορικά διαθέσιμη ομάδα αντιδραστηρίων RNeasy® Micro kit της εταιρίας Qiagen. Το κυτταρικό διάλυμα μεταφέρεται στους -80° C για μελλοντική χρήση
3. Απομόνωση ολικού RNA ακολουθώντας το πρωτόκολλο του RNeasy® Micro kit
4. Φωτομετρική ποσοτικοποίηση του απομονωμένου RNA, με τη χρήση της συσκευής NanoDrop 2000
5. Μεταφορά των RNA δειγμάτων στους -80° C για μελλοντική χρήση

Στο δεύτερο στάδιο, ακολουθεί η σύνθεση των cDNA βιβλιοθηκών, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εμπορικά διαθέσιμης ομάδας αντιδραστηρίων TruSeq RNA kit της εταιρίας Illumina, με κάποιες τροποποιήσεις που έγιναν από τον Dr. Ethan Ford. Η αρχική ποσότητα ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 500ng, και τα βασικά στάδια της σύνθεσης των cDNA βιβλιοθηκών, έχουν ως εξής:

1. Επιλογή και απομόνωση του αγγελιοφόρου RNA με poly-A επικαλυμμένα μαγνητικά σφαιρίδια
2. Σύνθεση της πρώτης, συμπληρωματικής προς το αγγελιοφόρο RNA, cDNA αλυσίδας
3. Σύνθεση της δεύτερης, συμπληρωματικής προς την πρώτη, cDNA αλυσίδας. Δημιουργία δίκλωνων cDNA μορίων
4. Απολίνωση (end repair) των άκρων των δίκλωνων cDNA μορίων
5. Προσθήκη βάσεων αδερίνης στο 3'-άκρο των δίκλωνων cDNA μορίων
6. Πρόσδεση των προσαρμογέων (adapters) στην ουρά βάσεων αδερίνης. Οι προσαρμογείς είναι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που περιλαμβάνουν από μια μοναδική αλληλουχία 6 νουκλεοτιδίων που μπορούν να αναγνωριστούν από τη συσκευή αλληλούχησης των cDNA βιβλιοθηκών και αποτελούν τη νουκλεοτιδική

«ταυτότητα» της βιβλιοθήκης, επιτρέποντας έτσι την πρόσμιξη έως και 12 διαφορετικών cDNA βιβλιοθηκών και την ταυτόχρονη ανάλυσή τους ως ένα δείγμα

7. Ενίσχυση των cDNA βιβλιοθηκών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
8. Ποσοτικοποίηση των cDNA βιβλιοθηκών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου
9. Ανάλυση του μεγέθους και εύρους των παραγόμενων cDNA τμημάτων των βιβλιοθηκών, με τη χρήση της συσκευής Agilent bioanalyzer 2100 και της εμπορικά διαθέσιμης ομάδας αντιδραστηρίων Agilent High Sensitivity DNA Kit, της εταιρίας Agilent
10. Ακολούθησε η ισομοριακή ανάμειξη των παραγόμενων cDNA βιβλιοθηκών

4.14. Αλληλούχιση cDNA βιβλιοθηκών

Η αλληλούχιση των cDNA βιβλιοθηκών έγινε στη μονάδα παροχής υπηρεσιών γενωμικής του Ινστιτούτου European Molecular Biology Laboratory (EMBL), με έδρα τη Χαϊδελβέργη της Γερμανίας. Η συσκευή αλληλούχισης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Illumina HiSeq και τα αποτελέσματα της αλληλούχισης αντιστοιχήθηκαν με γνωστά γονίδια και αναλύθηκαν ως προς τη διαφορική ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης, με βάση την αρνητική διωνυμική κατανομή (DESeq).

4.15. Βιοπληροφορική Ανάλυση

Η βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης των cDNA βιβλιοθηκών έγινε με τη χρήση του συστήματος Explain™ της εταιρίας BIOBASE. Κομμάτι αυτού του συστήματος αποτελεί το TRANSFAC®, που στηριζόμενο σε βάσεις δεδομένων και πειραματικά αποτελέσματα, επιτρέπει τη διερεύνηση χαρακτηριστικών ή και υποθετικών νουκλεοτιδικών μοτίβων στα οποία προσκολλώνται γνωστοί ή και άγνωστοι μεταγραφικοί παράγοντες.

4.16. Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση της ανάλυσης διακύμανσης μονής κατεύθυνσης (One-way ANOVA), όταν επρόκειτο για σύγκριση περισσότερων από 2 δειγμάτων, που συνδυάστηκε με δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων Bonferroni «Bonferroni's Multiple Comparison Test». Στην περίπτωση σύγκρισης 2 δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική ανάλυση t-test. Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$.

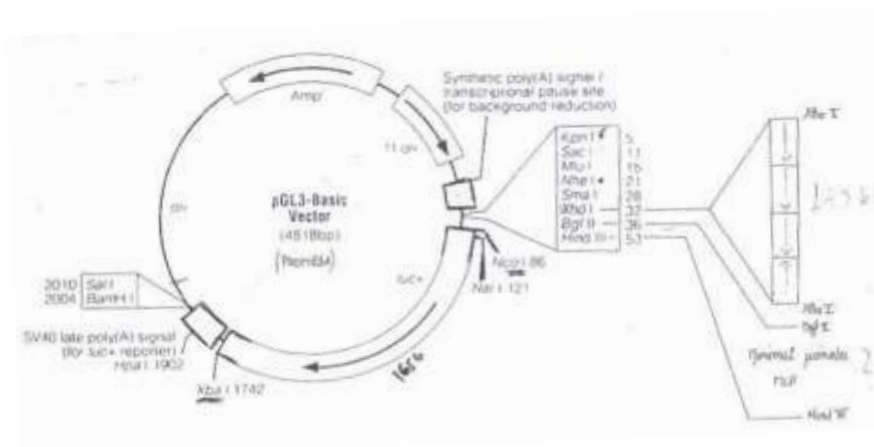
Κεφάλαιο 5

Αποτελέσματα

5.1. Δημιουργία της διαγονιδιακής κατασκευής

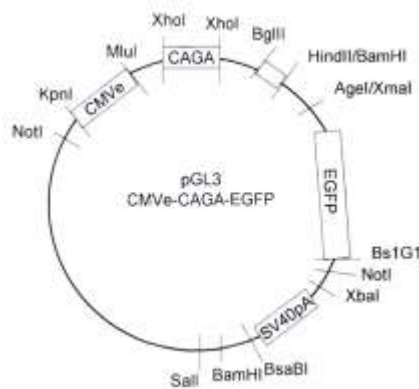
Για τη δημιουργία της διαγονιδιακής κατασκευής, απαιτήθηκαν μια σειρά από διαδοχικές ενζυμικές πέψεις και κλωνοποιήσεις, χρησιμοποιώντας τους πλασμιδιακούς φορείς που απεικονίζονται παρακάτω. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκαν:

- 1) Ο pGL3-Basic Vector της Promega (Cat. No E1751), στον οποίο, είχαν γίνει οι ακόλουθες τροποποιήσεις (Δώρο του Dr. Peter Ten Dijke) :
 - i) Στη θέση που ορίζεται από το ένζυμο περιορισμού *Xho*I, προστέθηκαν 12 επαναλήψεις της "caga" αλληλουχίας, 9 κατά την ορθή φορά και οι 3 τελευταίες κατά την αντίστροφη φορά, οριζόμενες εφεξής ως *caga*¹² ή *sbe* (smad binding element)
 - ii) Μεταξύ των θέσεων που ορίζονται από τα ένζυμα περιορισμού *Bgl*III και *Hind*III προστέθηκε ένα τμήμα του αδενοϊκού υποκινητή adenovirus major late promoter (MLP), που περιέχει το TATA box και τις παρακείμενες, ελάχιστα απαιτούμενες, ρυθμιστικές περιοχές

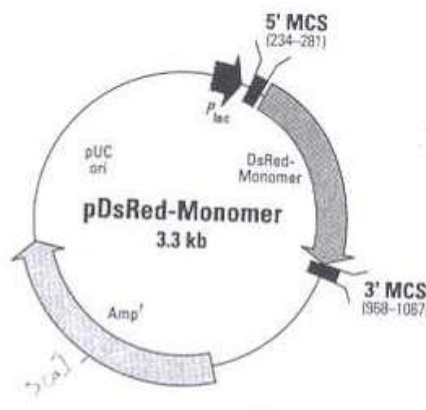


2) Ο pGL3-Basic Vector της Promega (Cat. No E1751), στον οποίο, είχαν γίνει οι ίδιες τροποποιήσεις όπως και στον παραπάνω φορέα (Δώρο της Dr. Christine Mummery), ενώ επιπρόσθετα :

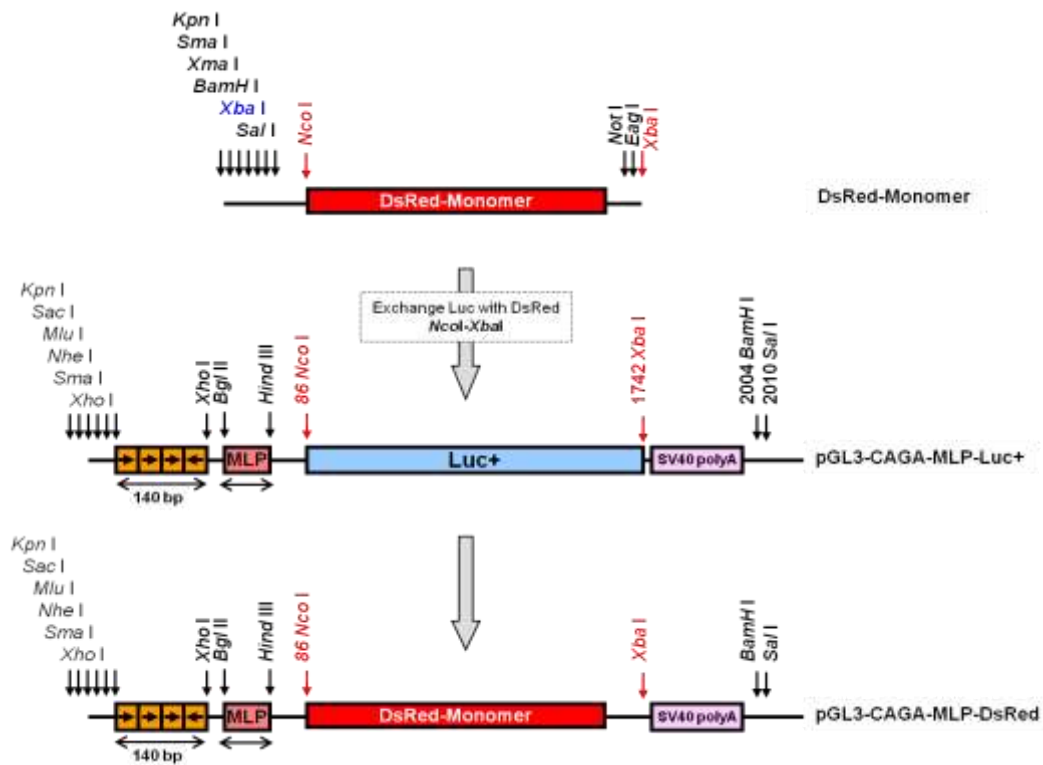
- i) Μεταξύ των θέσεων που ορίζονται από τα ένζυμα περιορισμού *KpnI* και *MluI* προστέθηκε το ελάχιστα απαιτούμενο τμήμα του υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού, CMV enhancer
- ii) Το cDNA του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης, αντικαταστάθηκε από αυτό της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης eGFP



3) Ο pDsRed-Monomer Vector της Clontech (Cat. No 632467).

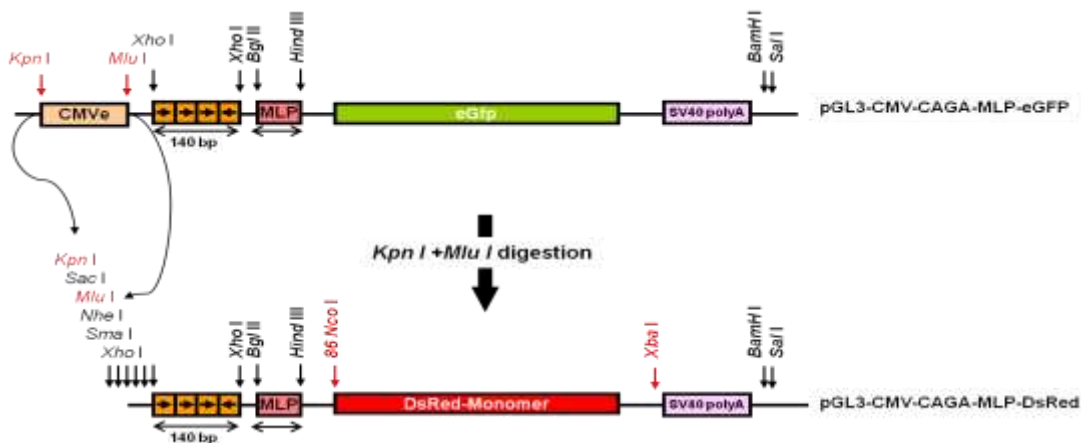


4) Ο pVZc-HS4 Forward vector (Δώρο του Δρ. Βασιλόπουλου Γεώργιου).



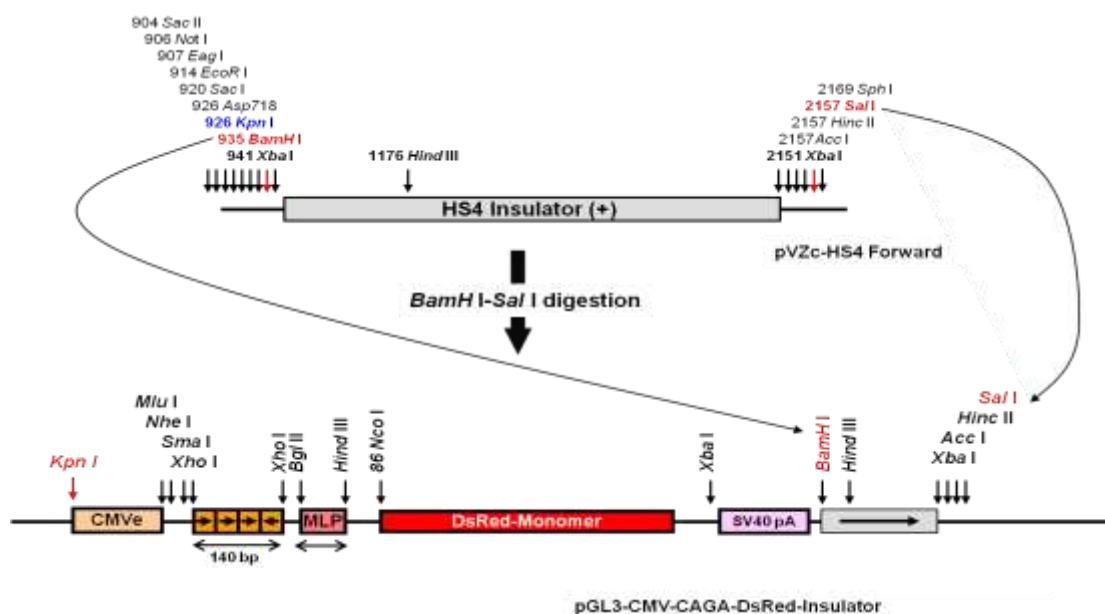
Εικόνα 4: Αντικατάσταση του γονιδίου της Λουσιφεράσης με το γονίδιο DsRed.

Ακολούθησε η προσθήκη του ελάχιστα απαιτούμενου τμήματος του υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού, CMVe. Το τμήμα που περιέχει τον CMVe απομονώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pGL3-CMV-e-caga-MLP-eGFP μετά απο ενζυμική πέψη του τελευταίου με τη χρήση των ενζύμων περιορισμού *KpnI* και *MluI*. Με τα ίδια ένζυμα έγινε και η πέψη του πλασμιδιακού φορέα pGL3-caga-MLP-DsRed και ακολούθησε αποφωσφορυλίωση του παραγόμενου προϊόντος, με τη χρήση του ενζύμου Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP). Το απομονωμένο τμήμα του CMVe, κλωνοποιήθηκε στον αποφωσφορυλιωμένο φορέα, με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης. Η ορθότητα της κλωνοποίησης ελέγχθηκε με πέψεις ελέγχου, χρησιμοποιώντας τα ένζυμα περιορισμού *KpnI* και *MluI*.



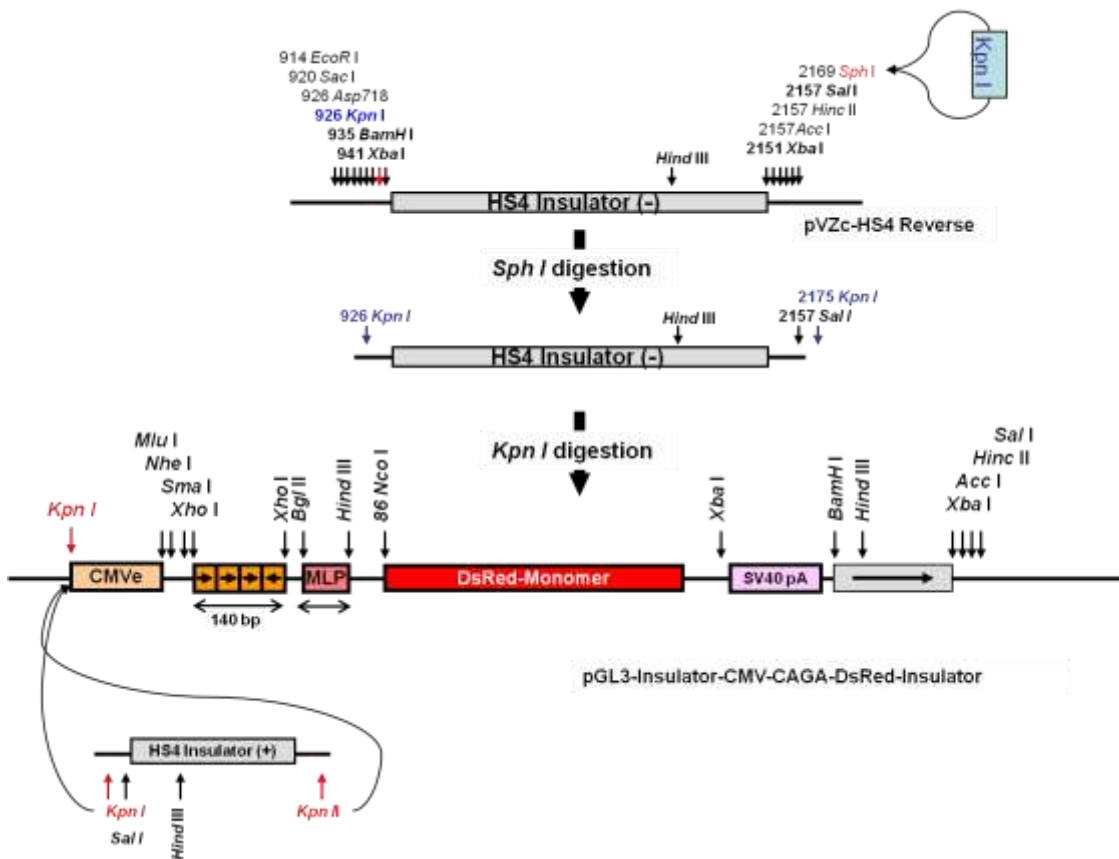
Εικόνα 5: Προσθήκη του ελάχιστου απαιτούμενου τμήματος του υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού CMVe.

Για να προστεθεί ο HS4 insulator στο 3'–άκρο της διαγονιδιακής κατασκευής, το τμήμα που περιέχει τον HS4 insulator απομονώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pVZc-HS4 Forward, με ενζυμική πέψη, χρησιμοποιώντας τα ένζυμα περιορισμού *BamHI* και *SalI*. Με τα ίδια ένζυμα έγινε διαδοχικά και η πέψη του πλασμιδιακού φορέα pGL3-Cmv-caga-MLP-DsRed και ακολούθησε αποφωσφορυλίωση του παραγόμενου προϊόντος με τη χρήση του ενζύμου Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP). Το απομονωμένο τμήμα του HS4 insulator κλωνοποιήθηκε στον αποφωσφορυλιωμένο φορέα με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης. Η ορθότητα της κλωνοποίησης ελέγχθηκε με πέψεις ελέγχου, χρησιμοποιώντας τα ένζυμα περιορισμού *BamHI*, *SalI* και *HindIII* αντίστοιχα.



Εικόνα 5: Εικόνα 6: Προσθήκη του HS4 insulator στο 3'–άκρο της διαγονιδιακής κατασκευής.

Ακολούθησε η προσθήκη του HS4 insulator στο 5'–άκρο της διαγονιδιακής κατασκευής. Σε αυτήν τη φάση, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pVZc-HS4 Reverse, στον οποίο, το τμήμα που περιέχει τον HS4 insulator έχει ενσωματωθεί με την αντίστροφη φορά. Έγινε ενζυμική πέψη του φορέα με *Sph*I και αποφωσφορυλίωση του παραγόμενου προϊόντος με τη χρήση του ενζύμου SAP. Ακολούθησε η κλωνοποίηση αυτού με έναν προσδέτη-linker, ο οποίος προέκυψε από τη σύζευξη των αλληλουχιών: CACGGTACCACGCATG (5'-3') και CGTGGTACCGTGCATG (5'-3'), με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης. Ο προσδέτης περιέχει μια νέα θέση αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού *Kpn*I, και για αυτό ονομάστηκε *Kpn*I linker. Η ορθότητα της κλωνοποίησης ελέγχθηκε με πέψεις ελέγχου, χρησιμοποιώντας τα ένζυμα περιορισμού *Kpn*I και *Hind*III, αντίστοιχα.



Εικόνα 7: Προσθήκη του HS4 insulator στο 5' –άκρο της διαγονιδιακής κατασκευής.

Με τη χρήση του *Kpn*I απομονώθηκε ο HS4 insulator και με το ίδιο ένζυμο έγινε και η πέψη του πλασμιδιακού φορέα pGL3-Cmv-caga-MLP-DsRed-HS4, ενώ ακολούθησε αποφωσφορυλίωση του παραγόμενου προϊόντος με τη χρήση του ενζύμου SAP. Ο HS4 insulator κλωνοποιήθηκε στον αποφωσφορυλιωμένο φορέα με τη χρήση της T4 DNA

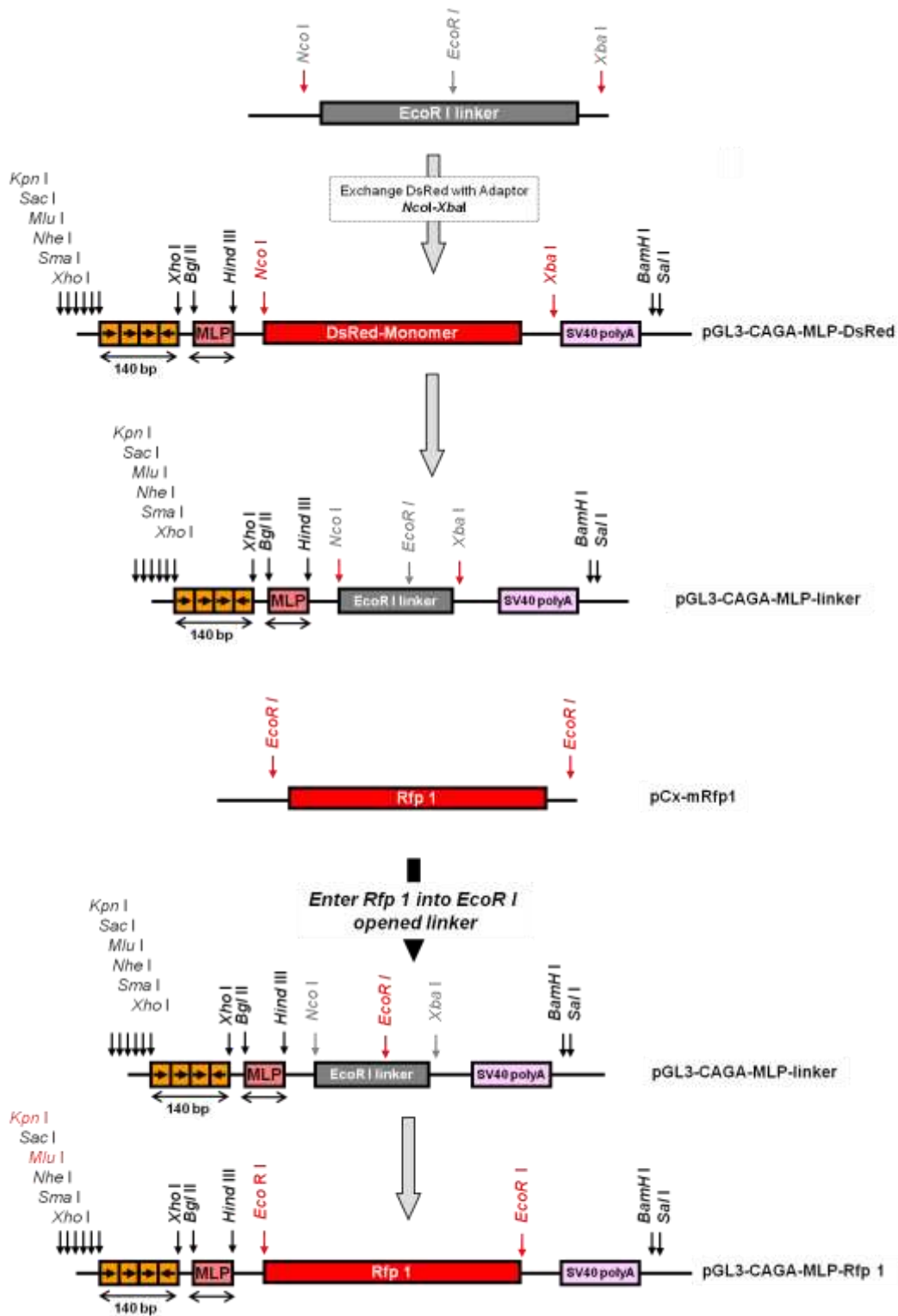
λιγάσης. Η ορθότητα της κλωνοποίησης ελέγχθηκε με πέψεις ελέγχου, χρησιμοποιώντας τα ένζυμα περιορισμού *KpnI*, *HindIII*, *BamHI* και *Sall*, αντίστοιχα.

Κατά την ανάλυση της έκφρασης της διαγονιδιακής κατασκευής που εξέφραζε το γονίδιο της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης DsRed, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του φθοριοχρώματος δεν ήταν υψηλά. Αυτό οφειλόταν κυρίως στις τροποποιήσεις που υπέστη η φθοροπρωτεΐνη προκειμένου να εκφράζεται ως μονομερές μόριο, μειώνοντας έτσι την κυτταροτοξικότητά της, αλλά μειώνοντας παράλληλα και την ικανότητα εκπομπής φθορισμού. Η δημιουργία νέων, πιο βελτιωμένων μονομερών μορφών κόκκινων φθορίζουσών πρωτεϊνών, όπως το mRFP (209), επέτρεψε την αντικατάσταση του γονιδίου του DsRed, οδηγώντας έτσι σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου.

Για την αντικατάσταση του γονιδίου αναφοράς της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης DsRed, με το γονίδιο αναφοράς της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης mRFP, έγινε ενζυμική πέψη του πλασμιδιακού φορέα pGL3-caga-MLP-DsRed, με τη χρήση των ενζύμων περιορισμού *NcoI* και *XbaI*, για την απομάκρυνση του τμήματος που περιέχει το γονίδιο αναφοράς DsRed. Στη θέση του απομακρυνθέντος τμήματος, κλωνοποιήθηκε ένας προσδέτης (linker) που προέκυψε από τη σύζευξη των αλληλουχιών: CATGGACTGAATTCACCTT (5'-3') και CTAGAAGTGAATTCAGTC (5'-3'), με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης. Ο προσδέτης περιέχει μια θέση αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού *EcoRI*, και για αυτό ονομάστηκε *EcoRI* linker. Η ορθότητα της κλωνοποίησης ελέγχθηκε με πέψεις ελέγχου, χρησιμοποιώντας τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI* και *Sall*.

Ακολούθησε ενζυμική πέψη του πλασμιδιακού φορέα pCx-mRFP με το ένζυμο περιορισμού *EcoRI*, για την απομόνωση του τμήματος που περιέχει το γονίδιο αναφοράς mRFP.

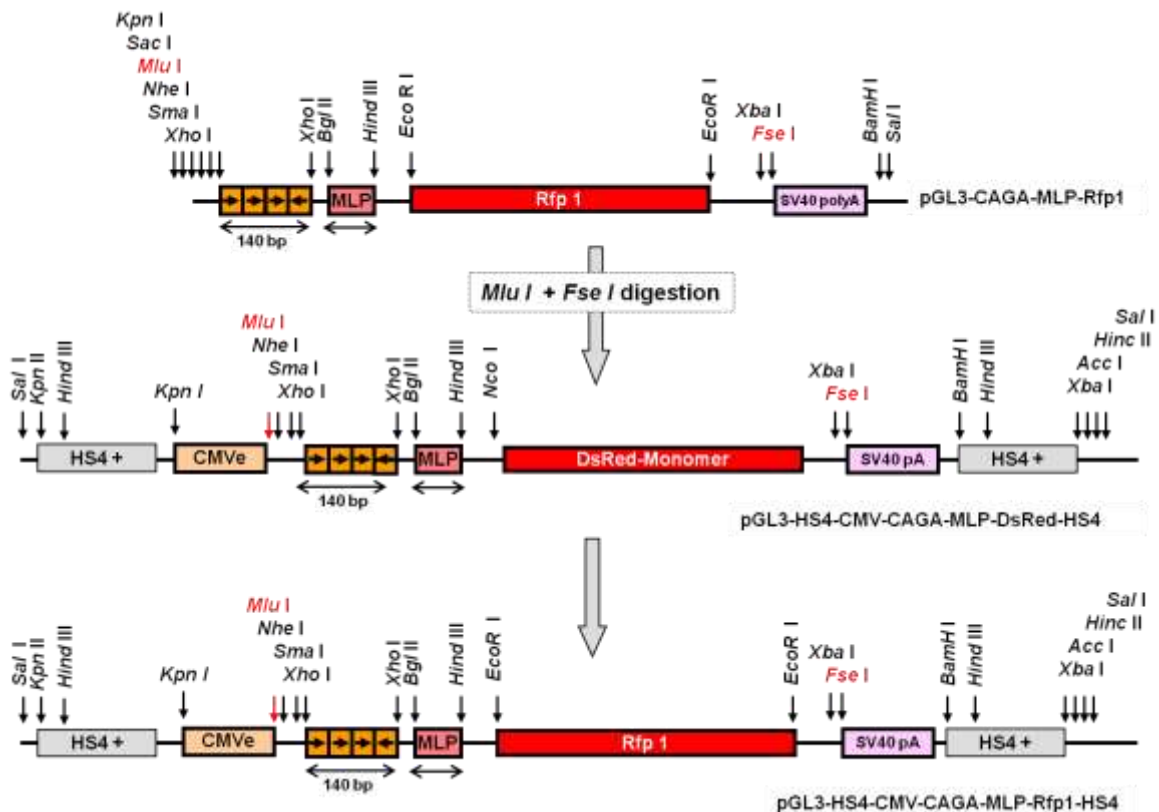
Στο φορέα pGL3-caga-MLP-*EcoRI* linker, πραγματοποιήθηκε ενζυμική πέψη με *EcoRI* και μετά από την αποφωσφορυλίωση του παραγόμενου προϊόντος με τη χρήση του ενζύμου SAP, ακολούθησε κλωνοποίηση του mRFP με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης. Η ορθότητα της κλωνοποίησης ελέγχθηκε με πέψεις ελέγχου, χρησιμοποιώντας τα ένζυμα περιορισμού *EcoRI*, *NcoI*, *HpaI*, *BamHI* και *MluI*.



Εικόνα 8: Αντικατάσταση του γονιδίου αναφοράς της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης DsRed , με το γονίδιο αναφοράς της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης mRFP.

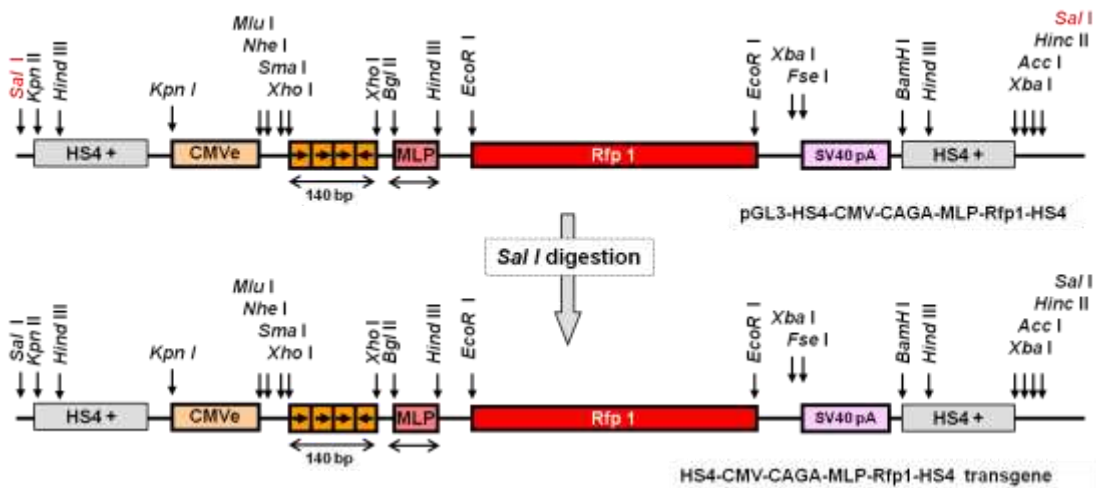
Ακολούθησε αντικατάσταση της κασέτας caga-MLP-DsRed με την κασέτα caga-MLP-mRFP. Έγινε ενζυμική πέψη του πλασμιδιακού φορέα pGL3-HS4-caga-MLP-DsRed-HS4, με τη χρήση

των ενζύμων περιορισμού *Mlu*I και *Fse*I, για να απομακρυνθεί το τμήμα που περιέχει την αλληλουχία *caga*-MLP-DsRed. Με τα ίδια ένζυμα έγινε διαδοχικά και η πέψη του πλασμιδιακού φορέα pGL3-*caga*-MLP-mRFP για την απομόνωση του τμήματος *caga*-MLP-mRFP, το οποίο και κλωνοποιήθηκε στον πρώτο φορέα με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης. Η ορθότητα της κλωνοποίησης ελέγχθηκε με πέψεις ελέγχου, χρησιμοποιώντας τα ένζυμα περιορισμού *Mlu*I, *Fse*I και *Sal*I.



Εικόνα 9: Αντικατάσταση της κασέτας *caga*-MLP-DsRed με την κασέτα *caga*-MLP-mRFP.

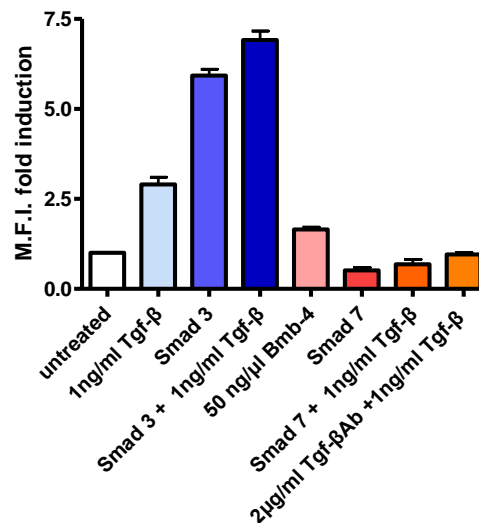
Για να απελευθερωθεί η διαγονιδιακή κατασκευή από τον pGL3 πλασμιδιακό φορέα, ακολούθησε ενζυμική πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Sal*I, αποκόπτοντας την κασέτα HS4-CMV-*caga*-MLP-mRFP-HS4, από τις υπόλοιπες πλασμιδιακές αλληλουχίες.



Εικόνα 10: Απομόνωση της διαγονιδιακής κατασκευής από τον πλασμιδιακό φορέα.

5.2. Έλεγχος της διαγονιδιακής κατασκευής στην κυτταρική σειρά HeLa

Μετά τη δημιουργία της διαγονιδιακής κατασκευής και προκειμένου αυτή να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία διαγονιδιακών μύων, κρίθηκε απαραίτητος ο προηγούμενος έλεγχος της ικανότητας της κατασκευής να ενεργοποιηθεί, μετά από σηματοδότηση από τον παράγοντα TGF- β , σε κυτταρικό επίπεδο.

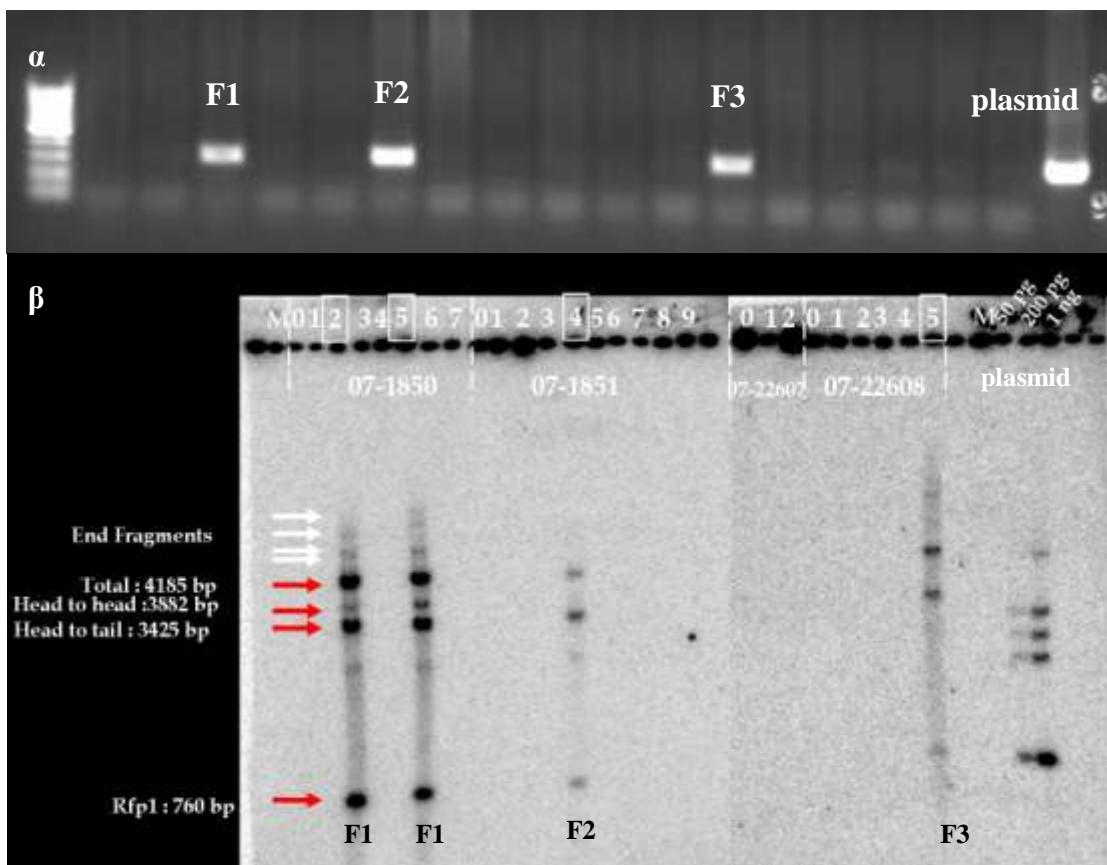


Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της μέσης έντασης φθορισμού στα HeLa κύτταρα, μετά από διαμόλυνση με το διαγονίδιο, υπό την παρουσία μορίων της υπερ-οικογένειας του TGF- β (n=3 ανά συνθήκη).

Από τον παραπάνω έλεγχο, διαπιστώθηκε ότι η διαγονιδιακή κατασκευή ενεργοποιήθηκε, όταν στην καλλιέργεια των HeLa κυττάρων υπερεκφράστηκε ο ενδοκυττάριος διαμεσολαβητής της TGF- β σηματοδότησης, Smad3, ή/και μετά από προσθήκη ανασυνδυασμένης TGF- β 1 πρωτεΐνης, ενώ η ενεργοποίηση της διαγονιδιακής κατασκευής αναστάλη όταν υπερεκφράστηκε ο ενδοκυττάριος αναστολέας της TGF- β σηματοδότησης Smad7, ή μετά από προσθήκη στην καλλιέργεια εξουδετερωτικού αντισώματος έναντι των TGF- β 1,2,3. Η ενεργοποίηση ήταν ειδική για τον TGF- β , αφού η προσθήκη ακόμα και μεγάλης ποσότητας ανασυνδυασμένης ανθρώπινης πρωτεΐνης BMP-4, δεν οδήγησε σε ανταπόκριση του διαγονιδίου.

5.3. Δημιουργία των TRE-RFP διαγονιδιακών σειρών μυών

Μετά τον έλεγχο της διαγονιδιακής κατασκευής στην κυτταρική σειρά HeLa, ακολούθησαν μικροενέσεις του διαγονιδίου σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων C57BL/6J μυών, από τις οποίες προέκυψε η δημιουργία οκτώ [8] διαγονιδιακών σειρών (Founders F1-F8).

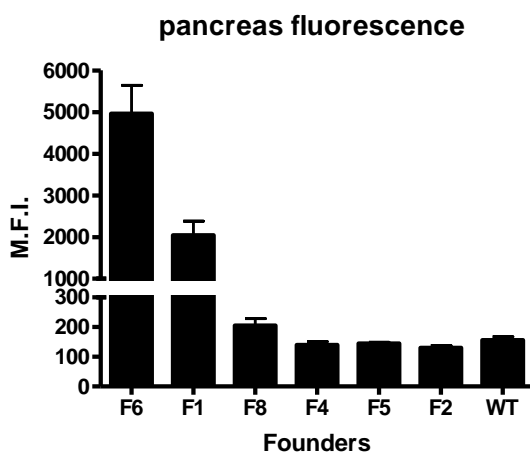


Εικόνα 12: PCR (α) και Southern blotting (β) ανάλυση των TRE-RFP διαγονιδιακών σειρών (F1: Founder1, F2:Founder2, F3:Founder3).

Η ένθεση του διαγονιδίου στο γένωμα των μυών ταυτοποιήθηκε πρώτα με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) έναντι του RFP και ακολούθησε η μέθοδος της ανίχνευσης ραδιοσημασμένων DNA τμημάτων-ιχνηθετών του διαγονιδίου (Southern blotting), όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 12α και 12β αντίστοιχα.

5.4. Επιλογή της διαγονιδιακής σειράς με την υψηλότερη έκφραση

Η μακροσκοπική ανάλυση των οργάνων από τις ληφθείσες διαγονιδιακές σειρές, με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού, αποκάλυψε υψηλή έκφραση του διαγονιδίου στο πάγκρεας, σε όλες τις σειρές (Εικόνα 13). Με βάση αυτό το όργανο, επιλέγει η σειρά που εξέφραζε τα υψηλότερα επίπεδα του διαγονιδίου, επιτρέποντας έτσι την -εις βάθος- ανίχνευση των κυτταρικών πληθυσμών που αποτελούν στόχους των TGF-β/Ακτιβινών. Ελήφθη εναιώρημα μεμονωμένων κυττάρων από το πάγκρεας και ο ποσοτικός προσδιορισμός της διαγονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της μέσης έντασης φθορισμού (mean fluorescence intensity, M.F.I.) του RFP ανά σειρά, με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής (BD Aria III). Ως αρνητικοί μάρτυρες για τη μέτρηση των βασικών επιπέδων αυτοφθορισμού των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν μύες που δε φέρουν το διαγονίδιο.

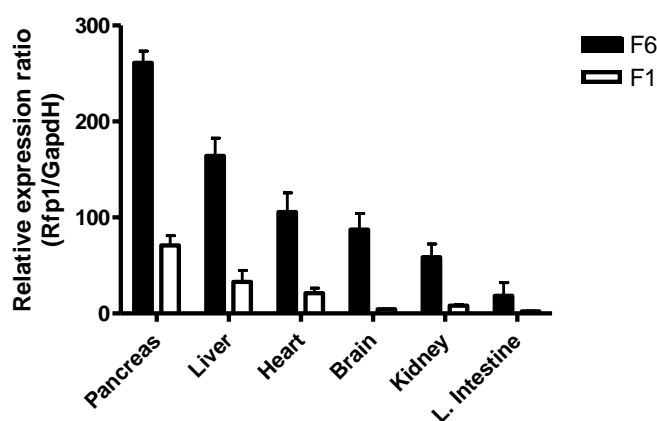


Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της μέσης έντασης φθορισμού του RFP σε εναιώρημα παγκρεατικών κυττάρων (n=3 ανά διαγονιδιακή σειρά).

5.5. Σύγκριση του προτύπου έκφρασης του RFP στα όργανα των F6 και F1 διαγονιδιακών σειρών

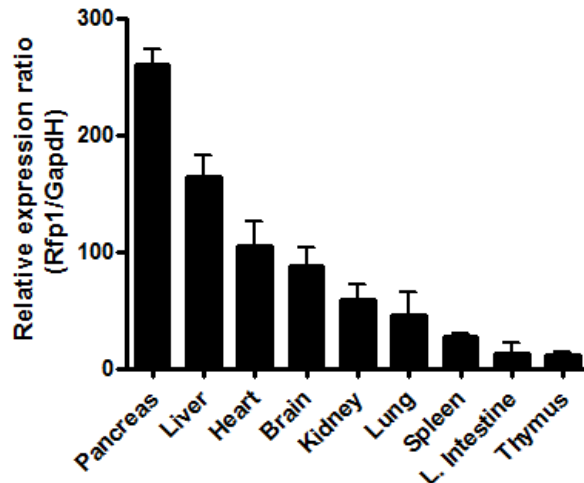
Απαραίτητο στοιχείο του χαρακτηρισμού των διαγονιδιακών σειρών που δημιουργήθηκαν, αποτέλεσε η διερεύνηση του προτύπου έκφρασης του διαγονιδίου. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο γενετικός τόπος (ή οι τόποι) όπου γίνεται η ένθεση του διαγονιδίου επηρεάζει σε τέτοιο βαθμό τη συμπεριφορά του, καθιστώντας το διαγονίδιο αναξιόπιστο και ακατάλληλο για περαιτέρω μελέτη.

Για να αποκλειστεί αυτό, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα mRNA του διαγονιδίου σε βασικά όργανα από τις δύο διαγονιδιακές σειρές, οι οποίες από την προηγούμενη ανάλυση προέκυψε ότι εξέφραζαν τα υψηλότερα επίπεδα του διαγονιδίου στο πάγκρεας (F6 και F1 διαγονιδιακές σειρές), με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). Επειδή η ένθεση των διαγονιδίων στις δύο σειρές έχει γίνει λογικά σε διαφορετικές θέσεις στο γένωμα, η ύπαρξη παρόμοιου προτύπου έκφρασης υποδεικνύει ότι ο γενετικός τόπος ένθεσης δεν επηρεάζει τη συμπεριφορά του διαγονιδίου.



Εικόνα 14: Real-Time PCR ανάλυση των επιπέδων mRNA του RFP στα όργανα που ελήφθησαν από τις διαγονιδιακές σειρές F6 & F1 (n=3 ανά διαγονιδιακή σειρά).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 14, το πρότυπο της έκφρασης του διαγονιδίου στα κύρια όργανα των δυο διαγονιδιακών σειρών, είναι πανομοιότυπο, ενισχύοντας την πεποίθηση ότι ο γενετικός τόπος της ένθεσης του διαγονιδίου, δεν επηρεάζει την έκφρασή του. Επίσης, είναι εμφανές ότι η σειρά F6 εκφράζει υψηλότερα επίπεδα του διαγονιδίου σε όλα τα όργανα, συγκριτικά με τη σειρά F1.



Εικόνα 15: Real-Time PCR ανάλυση των επιπέδων mRNA του RFP στα όργανα που ελήφθησαν από τη διαγονιδιακή σειρά F6 (n=3 ανά όργανο).

Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η σειρά F6 επελέγη για τη συνέχεια των αναλύσεων. Στην ίδια σειρά, ακολούθησε προσδιορισμός των επιπέδων mRNA του διαγονιδίου, σε μια πλειάδα οργάνων του σώματος (Εικόνα 15).

5.6. Έλεγχος των επιπέδων pSmad2 στα RFP⁺ και RFP⁻ κύτταρα του πνεύμονα

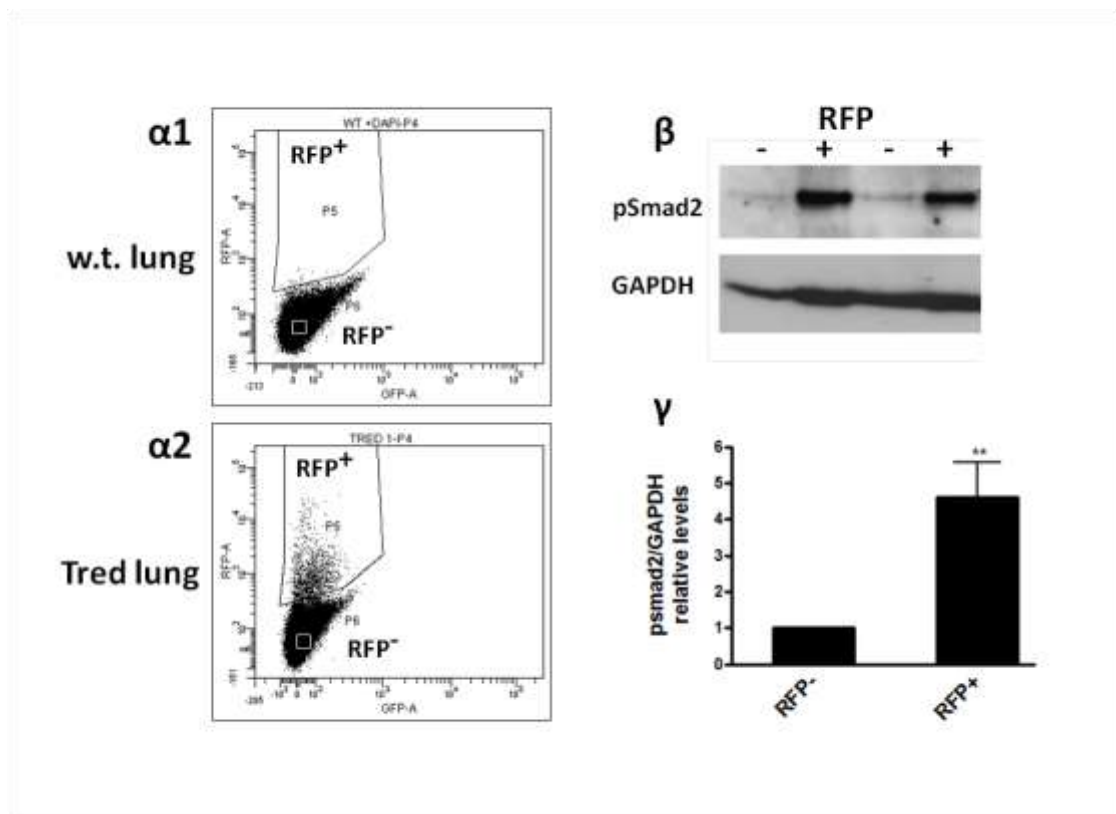
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το βασικό αποτέλεσμα της σηματοδότησης από τα μέλη της υπερ-οικογένειας των TGF-β/Ακτιβινών, είναι η ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση των Smad2/3, τα οποία θα μεταβούν στον πυρήνα και θα επάγουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων.

Για να διερευνηθεί κατά πόσον τα κύτταρα της TRE-RFP διαγονιδιακής σειράς εκφράζουν το διαγονίδιο μετά από την ενεργοποίηση του κανονικού σηματοδοτικού μονοπατιού των TGF-β/Ακτιβινών, επελέγησαν τα RFP⁺ και RFP⁻ κύτταρα μετά από ενζυμική πέψη του πνεύμονα και τον επακόλουθο διαχωρισμό των μεμονωμένων κυττάρων-προϊόντων της πέψης, στα οποία προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της pSmad2 πρωτεΐνης, με ανοσοσύτρωμα κατά Western.

Στην Εικόνα 16α φαίνεται το τελικό προϊόν της απομόνωσης των RFP⁺ και RFP⁻ κυττάρων από τον πνεύμονα διαγονιδιακών μυών. Ειδικότερα, απομονώθηκαν πνεύμονες από TRE-

RFP διαγονιδιακούς μύες τριών ημερών, καθώς και από μύες αγρίου τύπου (μάρτυρες) και ακολούθησε η ενζυμική τους πέψη, προκειμένου να προκύψει διάλυμα μεμονωμένων κυττάρων. Στη συνέχεια, συνελέγησαν τα ζωντανά πνευμονοκύτταρα [αρνητικά για τη χρωστική DAPI, (DAPI^{neg})], με τη χρήση κυτταροδιαχωριστή. Με βάση τις τιμές του δείγματος μάρτυρα, το οποίο δεν εκφράζει RFP (Εικόνα 16α1), διαχωρίστηκαν τα RFP⁺ (παράθυρο P5) και RFP⁻ (παράθυρο P6) κύτταρα, στα δείγματα που προήλθαν από τους διαγονιδιακούς μύες (Εικόνα 16α2).

Ακολούθησε η ανίχνευση των επιπέδων pSmad2 με ανοσοσύτρωμα κατά Western (Εικόνα 16β,γ), από την οποία προκύπτει ότι τα RFP⁺ κύτταρα εκφράζουν, στατιστικά σημαντικά, υψηλότερα επίπεδα pSmad2, συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα pSmad2 που ανιχνεύονται στα RFP⁻ κύτταρα.

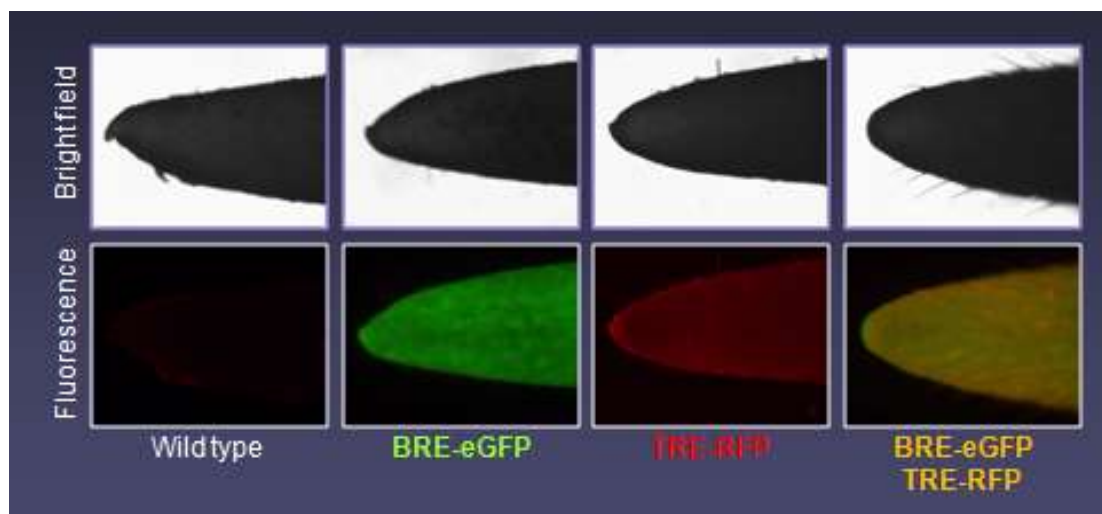


Εικόνα 16: α) Χαρακτηριστικό στικτόγραμμα κατανομής των RFP⁺ και RFP⁻ κυττάρων του πνεύμονα. β) Αντιπροσωπευτικό ανοσοσύτρωμα κατά Western με τη χρήση αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης pSmad2 στα RFP⁺ και RFP⁻ κύτταρα του πνεύμονα. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη-ελέγχου για το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών. γ) Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης pSmad2, μετά από κανονικοποίηση ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα της πρωτεΐνης GAPDH, στα RFP⁺ και RFP⁻ κύτταρα του πνεύμονα (n=3).

5.7. Διασταύρωση της TRE-RFP διαγονιδιακής σειράς με τη BRE-eGFP σειρά

Για να καταστεί δυνατή η ταυτόχρονη μελέτη των κυττάρων-στόχων των TGF-β/Ακτιβινών αλλά και των BMPs, ακολούθησε διασταύρωση της TRE-RFP διαγονιδιακής σειράς με τη σειρά που εξέφραζε BRE-eGFP (184). Τα κύτταρα της BRE-eGFP σειράς εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα χρωστική eGFP, όταν δέχονται σηματοδότηση από τους ενδοκυττάριους μεσολαβητές της κανονικής σηματοδότησης μέσω των BMPs, τους SMAD1/5/8.

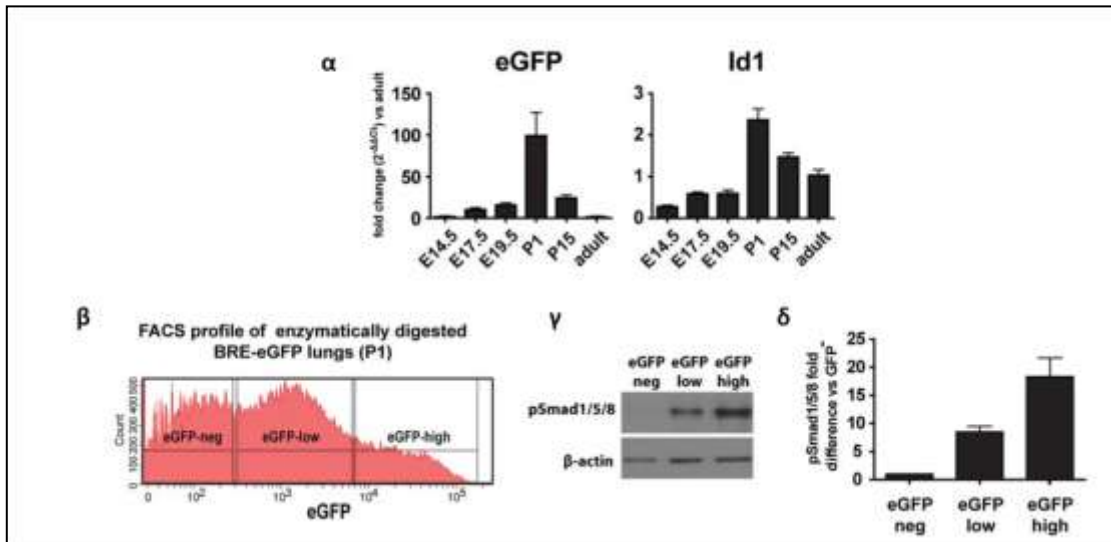
Η διάκριση των διαγονιδιακών μυών από τους αντίστοιχους μύες άγριου τύπου της ίδιας τοκετομάδας, κατέστη εφικτή μέσω, πέραν της γονοτύπησης με PCR, του απευθείας ελέγχου των eGFP και RFP φθοριοχρωμάτων στο τμήμα της ουράς που χρησιμοποιήθηκε για τη γονοτύπησή τους, με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Απευθείας παρατήρηση των eGFP και RFP φθοριοχρωμάτων με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού.

Αν και η ειδικότητα της διαγονιδιακής έκφρασης του eGFP ως προς τους BMPs έχει ήδη ταυτοποιηθεί και από άλλες μελέτες (184), επιπρόσθετα πειράματα εμπλούτισαν τα προηγούμενα ευρήματα. Συγκεκριμένα, δείγματα ολικού πνευμονικού ιστού από διάφορα αναπτυξιακά στάδια, χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή cDNA και τα επίπεδα έκφρασης του eGFP και *id1*, ενός γνωστού BMP επαγόμενου γονιδίου, προσδιορίστηκαν με Real-time PCR. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 18α, η κινητική της έκφρασης των δύο γονιδίων

είναι παρόμοια. Επιπλέον, απομονώθηκαν πνευμονοκύτταρα με κυτταροδιαχωρισμό, βάσει της έκφρασης του eGFP (Εικόνα 18β), σε eGFP-αρνητικά (eGFP^{neg}), eGFP-χαμηλής έκφρασης (eGFP^{med}) και eGFP-υψηλής έκφρασης (eGFP^{high}). Ακολούθησε ανοσοσύτρωμα κατά Western για την ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης των pSmad1/5/8 πρωτεϊνών (Εικόνα 18γ,δ), από το οποίο φαίνεται να υπάρχει μια γραμμική συσχέτιση της έκφρασης του eGFP και του pSmad1/5/8 (210).



Εικόνα 18: Χαρακτηρισμός της BMP-επαγόμενης έκφρασης του διαγονιδίου στη BRE-eGFP διαγονιδιακή σειρά.

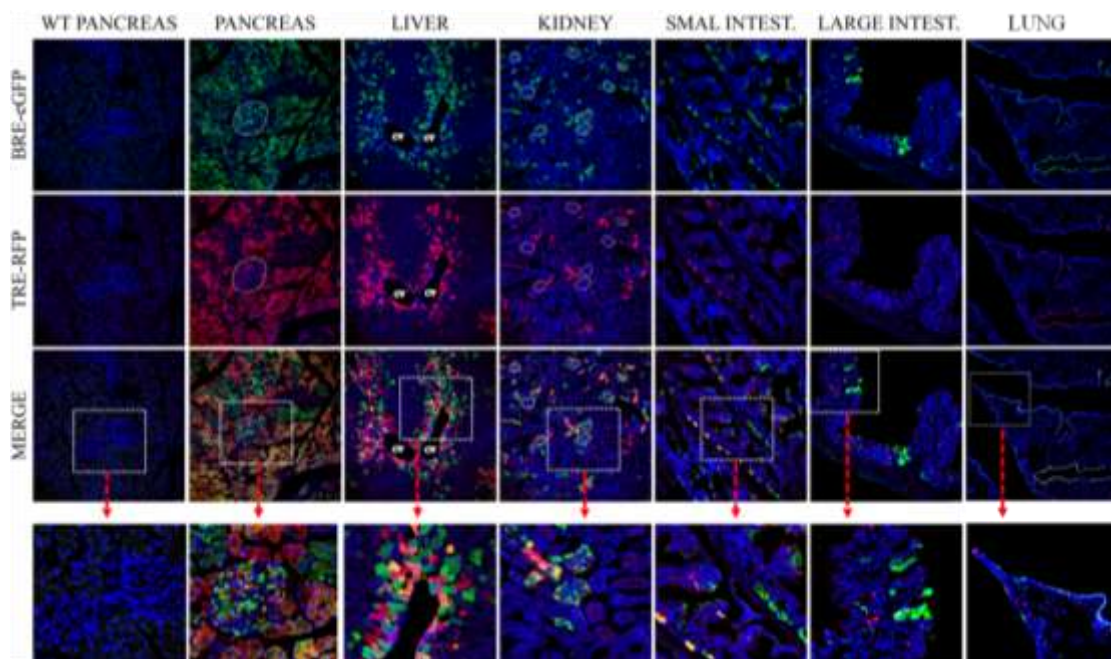
5.8. Ιστολογική ανάλυση της έκφρασης των διαγονιδίων σε βασικά όργανα ενήλικων TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακών μύων

Έχοντας πλέον τη δυνατότητα της ταυτόχρονης ανίχνευσης των κυττάρων-στόχων των TGF-β/Ακτιβινών αλλά και των BMPs, αναλύθηκε μια σειρά οργάνων του σώματος, ως προς το πρότυπο έκφρασης και τη σχετική κατανομή των διαγονιδίων, με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού έναντι των πρωτεϊνών eGFP και RFP.

Η πρώτη ανάλυση αφορούσε την ανίχνευση της έκφρασης του eGFP και του RFP σε όργανα που ελήφθησαν από ενήλικες (ηλικίας δύο μηνών) TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακούς μύες. Στη συγκεκριμένη ηλικία, έχει ολοκληρωθεί η ανάπτυξη όλων των οργάνων του σώματος και οι μύες είναι σεξουαλικά και ορμονικά ώριμοι. Σε όλες τις αναλύσεις, χρησιμοποιήθηκαν παρθένοι θηλυκοί μύες. Η πρώτη ανάλυση επικεντρώθηκε

στη μελέτη του πνεύμονα, λόγω της εμπειρίας της ερευνητικής ομάδας του Κέντρου Ανοσολογίας και Μεταμοσχεύσεων του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. στη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και την παθοφυσιολογία αυτού του οργάνου. Η ανάλυση επικεντρώθηκε επίσης στην ανίχνευση της έκφρασης των διαγονιδίων στα κύρια όργανα του πεπτικού σωλήνα, λόγω της εμπειρίας της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη μελέτη της παθολογίας αυτών (211).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 18, η ισχυρότερη έκφραση και των δύο διαγονιδίων εντοπίζεται στο πάγκρεας, όπως αναμενόταν και από τα ευρήματα της ανάλυσης των επιπέδων του mRNA (Εικόνα 15), ενώ και στα υπόλοιπα όργανα που μελετήθηκαν, όπως το ήπαρ, το νεφρό, το λεπτό και το παχύ έντερο και ο πνεύμονας, ανιχνεύτηκε η παρουσία και των δύο διαγονιδίων σε συγκεκριμένες ανατομικές περιοχές αυτών των οργάνων.



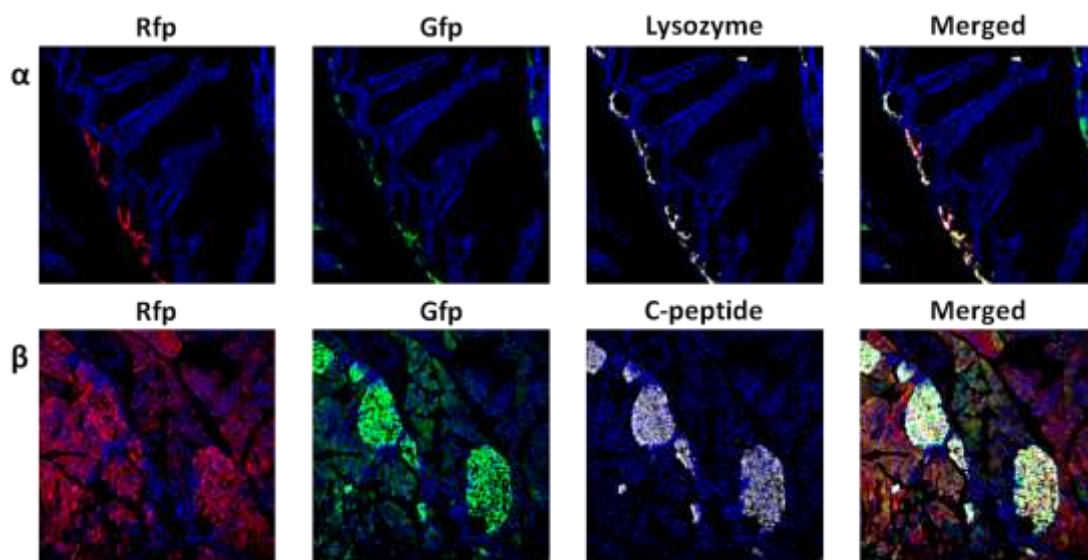
Εικόνα 19: Ανίχνευση της κατανομής των διαγονιδίων στους TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακούς μύες, με μικροσκοπία φθορισμού. Ανάλυση του παγκρέατος, του ήπατος, του νεφρού, του λεπτού και παχέως εντέρου και του πνεύμονα.

Για να χαρακτηριστούν οι ανατομικές περιοχές στις οποίες εντοπίζονται τα δύο διαγονίδια, ακολούθησε χρώση έναντι συγκεκριμένων δεικτών. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε χρώση τομών του λεπτού εντέρου έναντι της λυσοζύμης (Lysozyme), ενός ενζύμου που παράγεται ειδικά από τα Paneth κύτταρα που εντοπίζονται στις κρύπτες του συγκεκριμένου

οργάνου. Σε τομές παγκρεατικού ιστού, έγινε χρώση έναντι του C-πεπτιδίου που χαρακτηρίζει τα β-ινσουλινοπαραγωγά κύτταρα της ενδοκρινούς μοίρας του οργάνου.

Από τις παραπάνω χρώσεις προκύπτει το συμπέρασμα ότι, τα κύτταρα που βρίσκονται υπό τη δράση της υπερ-οικογένειας των TGF-β/Ακριβινών και BMPs στο λεπτό έντερο, εντοπίζονται στις κρύπτες του οργάνου (Εικόνα 20α). Στο πάγκρεας υπάρχει ισχυρή έκφραση και των δύο διαγονιδίων, στην ενδοκρινή και την εξωκρινή μοίρα του οργάνου (Εικόνα 20β).

Για το χαρακτηρισμό των κυττάρων του πνεύμονα και του ήπατος, που δέχονται σηματοδότηση από τα μέλη της TGF-β υπερ-οικογένειας, ακολούθησε μια σειρά χρώσεων, ενώ ταυτόχρονα διερευνήθηκε η κατανομή αυτών των κυττάρων κατά την ανάπτυξη, αλλά και σε καταστάσεις φλεγμονής και ιστικής βλάβης, όπως περιγράφεται παρακάτω.



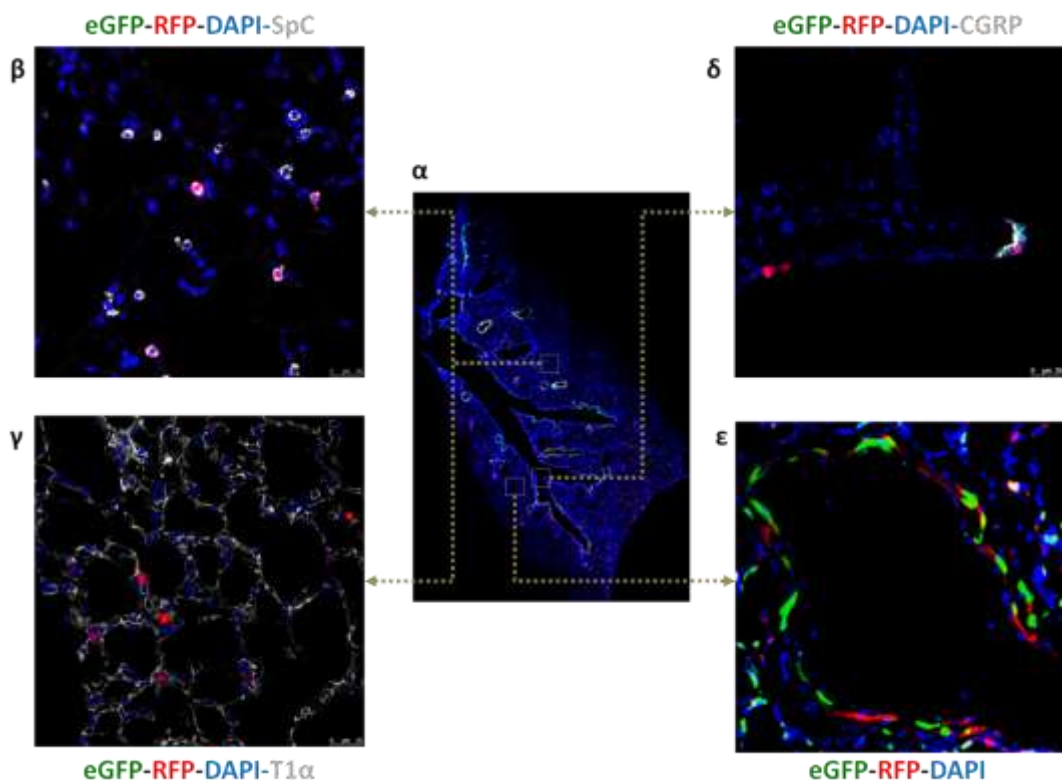
Εικόνα 20: Χαρακτηρισμός των ανατομικών περιοχών στις οποίες εντοπίζονται τα δύο διαγονίδια, στους TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακούς μύες, με ανοσοφθορισμό. Ανάλυση του: α) λεπτού εντέρου, β) παγκρέατος.

5.9. Χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης των διαγονιδίων κατά την ανάπτυξη και την ομοιόσταση του πνεύμονα των TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακών μυών

Για το χαρακτηρισμό των κυτταρικών πληθυσμών που εκφράζουν τα διαγονίδια στον πνεύμονα, χρησιμοποιήθηκε μια σειρά δεικτών: Η σουλφακτάνη C και η προ-μορφή της pro-SpC εκφράζονται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου II, η γλυκοπρωτεΐνη podoplanin ή

T1α εκφράζεται από τα πνευμονοκύτταρα τύπου I, το πεπτιδίο Calcitonin gene-related peptide (CGRP) εκφράζεται στα νευροενδοκρινή κύτταρα του βρογχικού επιθηλίου, ο επιφανειακός δείκτης CD31 εκφράζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και η άλφα ακτίνη του λείου μυϊκού ιστού (α SMA) εκφράζεται από τα λεία μυϊκά κύτταρα που διαστρωματώνονται στην έξω επιφάνεια των αγγείων.

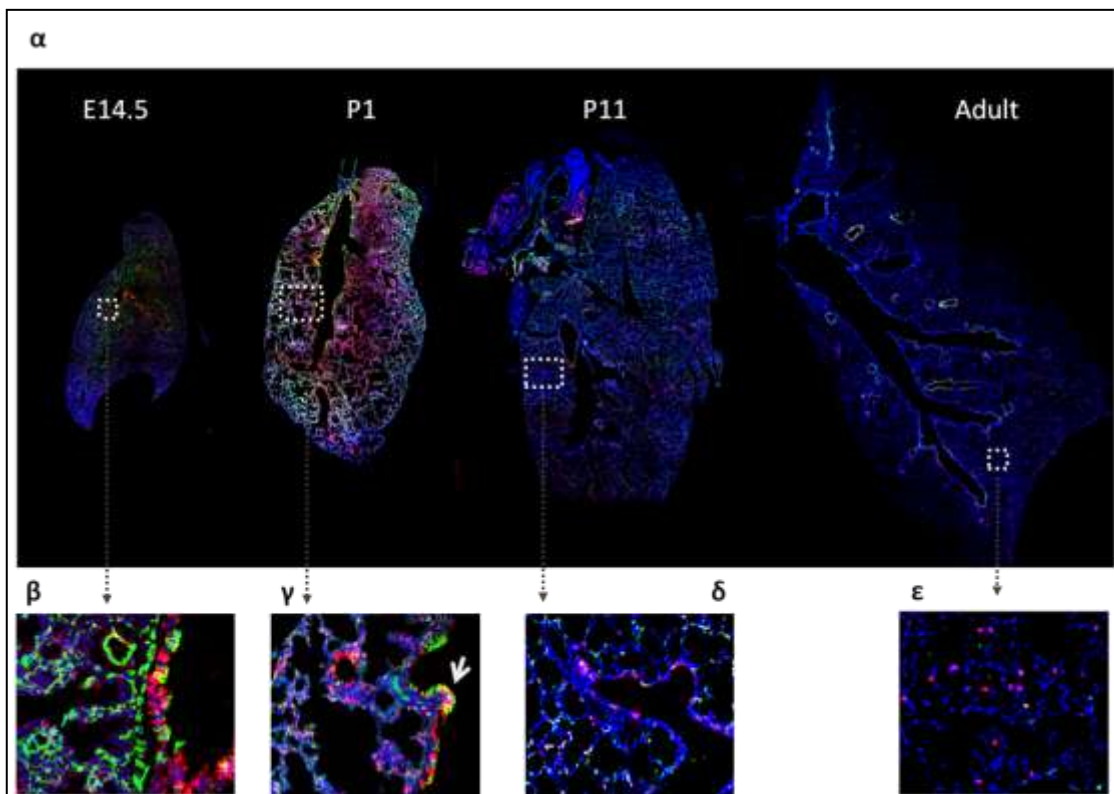
Από την παραπάνω ανάλυση φαίνεται ότι στο πνευμονικό παρέγχυμα, και πιο συγκεκριμένα στις κυψελίδες, εντοπίζονται ελάχιστα $eGFP^+$ κύτταρα, ενώ υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός RFP^+ κύτταρων, τα οποία είναι θετικά για το δείκτη των πνευμονοκυττάρων τύπου-II (pro-SpC) (Εικόνα 21β) και αρνητικά για το δείκτη των πνευμονοκυττάρων τύπου-I (T1α) (Εικόνα 21γ). Στο βρογχικό επιθήλιο, τα $eGFP^+$ και RFP^+ κύτταρα εντοπίζονται κυρίως στις διακλαδώσεις του βρογχικού δέντρου (εικόνα 21δ), όπου εντοπίζονται και τα νευροενδοκρινή ($CGRP^+$) κύτταρα. Τέλος, γύρω από τα αγγεία, αλλά όχι στο στρώμα των λείων μυϊκών κυττάρων, εντοπίζονται περιοχές με πεπλατυσμένα $eGFP^+$ και RFP^+ κύτταρα (Εικόνα 21ε).



Εικόνα 21: Ανίχνευση της πνευμονικής κατανομής των διαγονιδίων στους TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακούς μύες, με ανοσοσφθορισμό: α) Αντιπροσωπευτική εικόνα του πνευμονικού

ιστού. β) Χρώση για RFP, eGFP και Pro-Spc. γ) Χρώση για RFP, eGFP και T1α. δ) Χρώση για RFP, eGFP και CGRP. ε) Χρώση για RFP, eGFP και αSMA.

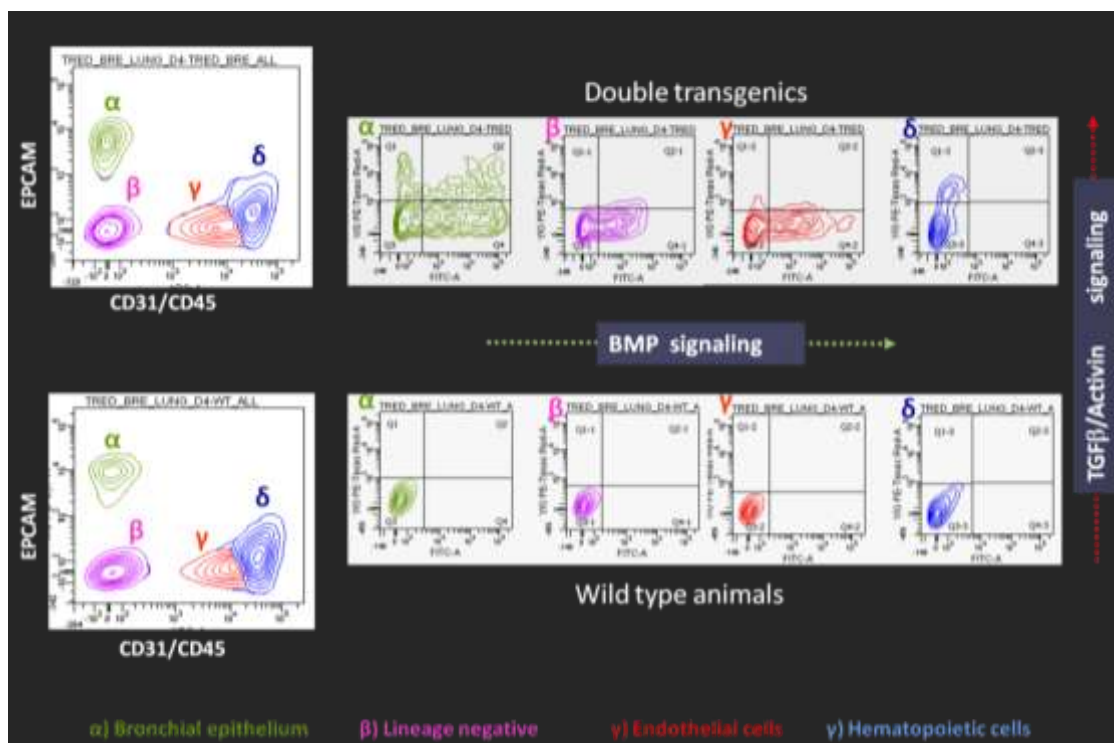
Σημαντική παράμετρος για την κατανόηση του ρόλου της υπερ-οικογένειας του TGF-β στη λειτουργία και την παθοφυσιολογία του πνεύμονα, αλλά και των άλλων υπό μελέτη οργάνων, είναι η ανάλυση της έκφρασης των διαγονιδίων κατά την ανάπτυξη. Έτσι, μπορεί να γίνει η καταγραφή του χωροχρονικού προτύπου έκφρασης των διαγονιδίων, αλλά και να διερευνηθεί αν οι ίδιοι σηματοδοτικοί μηχανισμοί που δρουν κατά την ανάπτυξη, επανενεργοποιούνται σε καταστάσεις ιστικής βλάβης.



Εικόνα 22: Ανίχνευση της κατανομής των διαγονιδίων στους TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακούς μύες κατά την ανάπτυξη του πνεύμονα, με ανοσοφθορισμό: α) Αντιπροσωπευτικές τομές από τα υπό μελέτη αναπτυξιακά στάδια. Ακολουθούν επιλεγμένες μεγεθύνσεις από: β) Το στάδιο E17.5, γ) Νεογέννητο μυ, δ) Το στάδιο P11, ε) Τον ενήλικα μυ (P60).

Από αυτήν την ανάλυση φαίνεται ότι κατά την εμβρυϊκή φάση E17.5 υπάρχει έντονη έκφραση του eGFP στα κύτταρα του βρογχικού επιθηλίου, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα δομικά κύτταρα του πνευμονικού παρεγχύματος (210) (Εικόνα 22β). Τα κύτταρα που εκφράζουν RFP βρίσκονται κυρίως στο βρογχικό επιθήλιο. Από την ανάλυση των ιστών που

προήλθαν από νεογέννητους μύες, φαίνεται ότι το eGFP αλλά και το RFP εκφράζονται ακόμα πιο έντονα, με τα δυο φθοριοχρώματα να εντοπίζονται έντονα στα δομικά κύτταρα (πνευμονοκύτταρα) του πνευμονικού παρεγχύματος (Εικόνα 22γ). Στον ιστό που προέρχεται από μύες ηλικίας έντεκα [11] ημερών, η έκφραση του eGFP περιορίζεται σημαντικά κυρίως στα τύπου-II πνευμονοκύτταρα και στα κύτταρα που εντοπίζονται στις διακλαδώσεις του βρογχικού επιθηλίου (210), ενώ το RFP παραμένει κυρίως σε ένα ποσοστό τύπου-II πνευμονοκυττάρων (Εικόνα 22δ). Τέλος, στον ενήλικα πνεύμονα (Εικόνα 22ε), η έκφραση του eGFP περιορίζεται ακόμα περισσότερο, ενώ η έκφραση του RFP, αν και περιορισμένη σε σχέση με τα προηγούμενα αναπτυξιακά στάδια, παραμένει σε ένα ποσοστό τύπου-II πνευμονοκυττάρων.

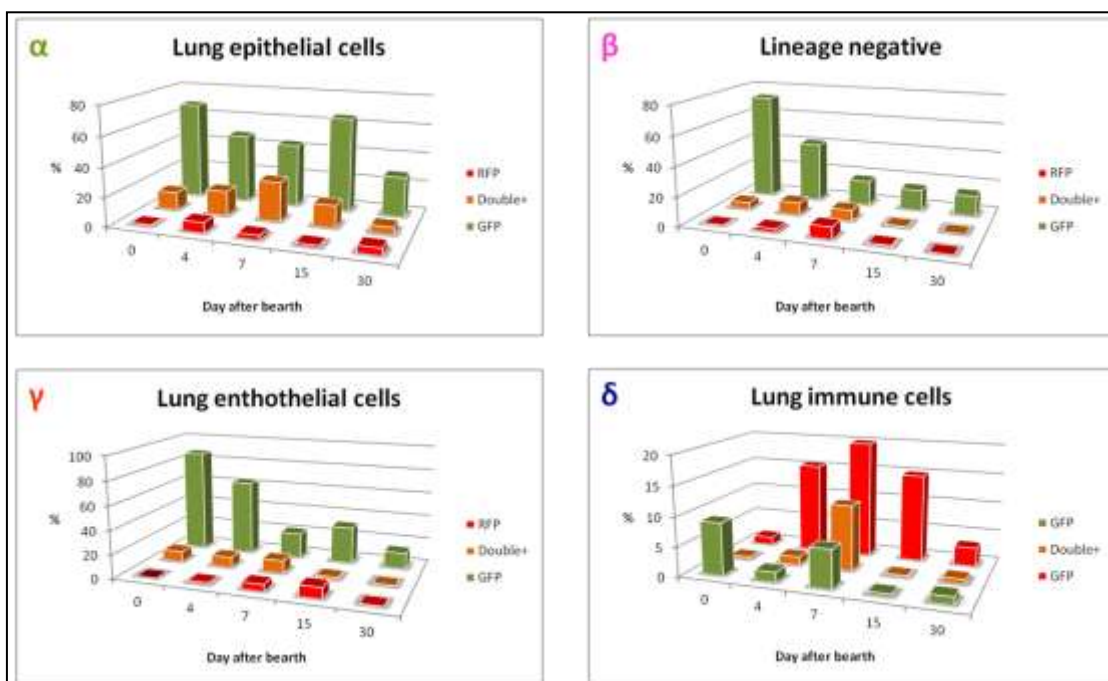


Εικόνα 23: Ανίχνευση της κατανομής των διαγονιδίων στους TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακούς μύες κατά την ανάπτυξη του πνεύμονα, με κυτταρομετρία ροής: α) Επιθηλιακά κύτταρα, β) Κύτταρα αρνητικά για τους υπό μελέτη δείκτες, γ) Ενδοθηλιακά κύτταρα, δ) Κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς.

Για να αναλυθούν με μεγαλύτερη ακρίβεια οι κυτταρικοί πληθυσμοί που εκφράζουν τα διαγονίδια κατά τη φάση της ανάπτυξης του πνεύμονα, πραγματοποιήθηκε ενζυμική πέψη του ιστού και στο εναιώρημα μεμονωμένων κυττάρων που προέκυψε, αφού έγιναν χρώσεις για τον εντοπισμό των επιθηλιακών κυττάρων (EPCAM-PE/Cy7), των ενδοθηλιακών

κυττάρων (CD31-APC) και των κυττάρων της αιμοποιητικής σειράς (CD45-APC), ελέγχθηκε το πρότυπο έκφρασης των διαγονιδίων eGFP και RFP, με κυτταρομετρία ροής. Ο πληθυσμός που δεν εκφράζει κανέναν από τους παραπάνω δείκτες (lineage negative), αποτελείται κυρίως από μεσεγχυματικά κύτταρα και άλλα δομικά στοιχεία του πνεύμονα. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν πνεύμονες που απομονώθηκαν από TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακούς μύες, ηλικίας 0, 4, 7, 15 και 30 ημερών. Στην Εικόνα 23 φαίνεται το πρότυπο των συγκεκριμένων πληθυσμών μετά από ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

Από αυτήν την ανάλυση προσδιορίστηκε το ποσοστό των eGFP⁺ και RFP⁺ κυττάρων στους υπό μελέτη πληθυσμούς. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 24α, το ποσοστό των eGFP⁺ επιθηλιακών κυττάρων παραμένει σταθερό μέχρι την 15^η μέρα και μετά ελαττώνεται, το ποσοστό των RFP⁺ κυττάρων παραμένει χαμηλό και σταθερό σε όλα τα στάδια της ανάλυσης, ενώ υπάρχει μια σταδιακή αύξηση και μετά πτώση των eGFP-RFP διπλά θετικών κυττάρων, με την κορύφωση της έκφρασης να επιτελείται επτά ημέρες μετά τη γέννα. Η έκφραση του eGFP στα ενδοθηλιακά και μεσεγχυματικά κύτταρα (Εικόνα 24β,γ) ακολουθεί πτωτική πορεία όσο εξελίσσεται η ανάπτυξη του οργάνου, ενώ η έκφραση του RFP παραμένει χαμηλή.



Εικόνα 24: Αναπαράσταση των ποσοστών των RFP⁺, eGFP⁺ και διπλά (RFP⁺/eGFP⁺) θετικών κυττάρων στον πνεύμονα, με κυτταρομετρία ροής: α) Επιθηλιακά κύτταρα, β) Κύτταρα αρνητικά για τους υπό μελέτη δείκτες, γ) Ενδοθηλιακά κύτταρα, δ) Κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς.

Τέλος, στα κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς παρατηρήθηκε μια σταδιακή κορύφωση της έκφρασης του RFP επτά ημέρες μετά τη γέννα, συνοδευόμενη από την αντίστοιχη κορύφωση του ποσοστού των eGFP-RFP διπλά θετικών κυττάρων και μετά πτώση της έκφρασης του RFP (Εικόνα 24δ).

Από την παραπάνω ανάλυση έγινε αντιληπτό ότι και τα δύο διαγονίδια εκφράζονται σε όλους τους πληθυσμούς του πνεύμονα, κατά τις φάσεις της ανάπτυξης και της ενήλικης ζωής. Αν και αυτό αναδεικνύει τον κεντρικό ρόλο του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β για τη λειτουργία αυτού του οργάνου, δίνοντας το έναυσμα για περαιτέρω ανάλυση της διαγονιδιακής έκφρασης σε καταστάσεις φλεγμονής και ιστικής βλάβης, η πολυπλοκότητα και ο αριθμός των διαφόρων κυτταρικών τύπων που απαρτίζουν τον πνεύμονα, σε συνδυασμό με το δυναμικό πρότυπο έκφρασης των διαγονιδίων, κατέστησε ιδιαίτερα δύσκολη την επιλογή ενός κυτταρικού πληθυσμού για περαιτέρω ανάλυση της TGF-β/Activin και BMP επαγόμενης γονιδιακής έκφρασης.

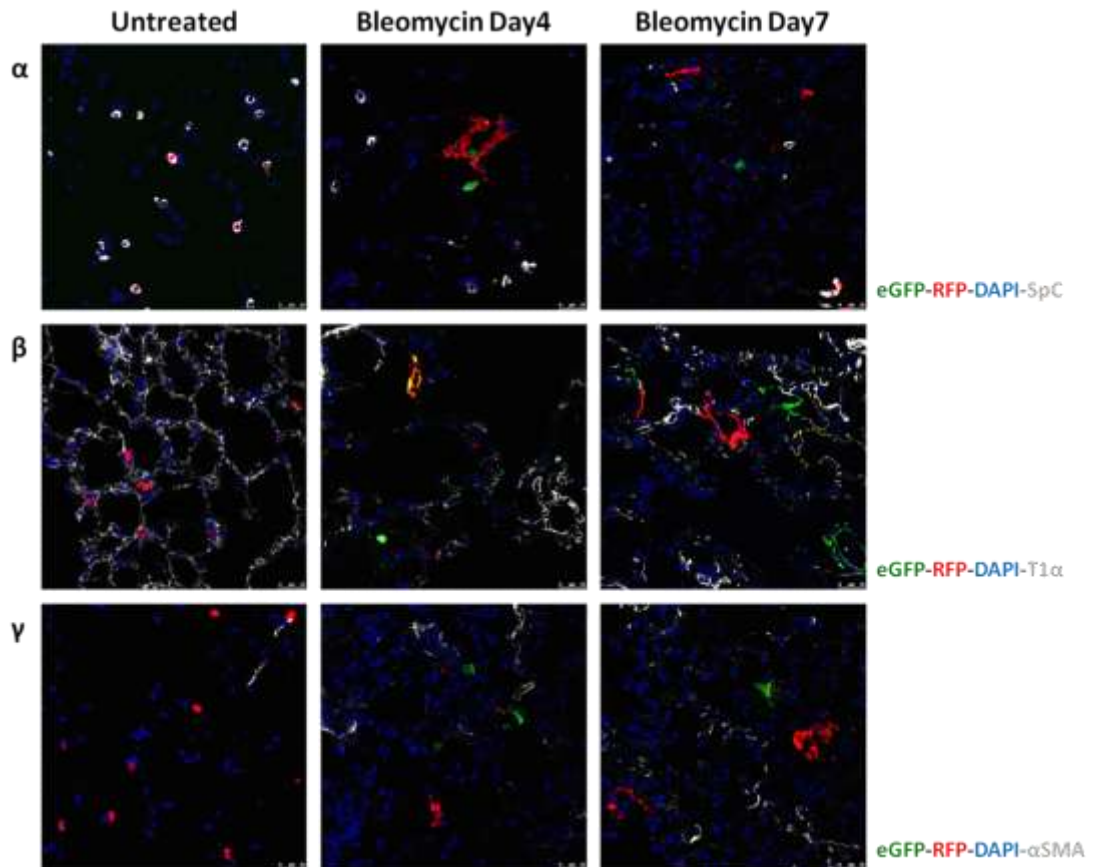
5.10. Έκφραση των διαγονιδίων σε ζωικά μοντέλα πνευμονικής βλάβης

Για να μελετηθεί ο ρόλος των μελών της υπερ-οικογένειας του TGF-β σε παθολογικές καταστάσεις φλεγμονής και ίνωσης στον πνεύμονα, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ζωικά μοντέλα:

- i) Το μοντέλο πρόκλησης πνευμονικής ίνωσης μετά από ενδοτραχειακή χορήγηση μπλεομυκίνης, στους TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακούς μύες.
- ii) Το μοντέλο καταστροφής του βρογχικού επιθηλίου μετά από συστηματική χορήγηση ναφθαλενίου, με τη χρήση των TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακών μυών.
- iii) Το μοντέλο πρόκλησης πνευμονικής φλεγμονής μετά από ευαισθητοποίηση με οβαλβουμίνη, με τη χρήση των TRE-RFP διαγονιδιακών μυών.

Σε όλα τα πειραματικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν, ακολούθησε αδρή καταγραφή της έκφρασης των διαγονιδίων, ούτως ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσον υπάρχει εμπλοκή του TGF-β σηματοδοτικού μονοπατιού στην εξέλιξη της παθολογίας, αποτελώντας έτσι το εφαλτήριο για μελλοντικές, πιο διεξοδικές μελέτες.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στο κυψελιδικό παρέγχυμα του ενήλικα πνεύμονα, εντοπίζεται ένα ποσοστό πνευμονοκυττάρων τύπου II τα οποία είναι RFP⁺, ενώ το eGFP δεν εκφράζεται σχεδόν καθόλου στις κυψελίδες, αλλά εστιάζεται κυρίως στα νευροεπιθηλιακά σωματίδια του βρογχικού επιθηλίου και γύρω από τα πνευμονικά αγγεία (210).



Εικόνα 25: Χαρακτηρισμός των GFP και RFP θετικών κυττάρων στο μοντέλο πνευμονικής ίνωσης μετά από χορήγηση μπλεομυκίνης, με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού. Χαρακτηριστικές χρώσεις έναντι των:α) Pro-SpC, β) T1α, και γ) αSMA.

Σε μια προσπάθεια να χαρακτηριστούν οι κυτταρικοί πληθυσμοί που εκφράζουν τα διαγονίδια στο μοντέλο της πνευμονικής ίνωσης μετά από τη χορήγηση μπλεομυκίνης, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει επανενεργοποίηση του eGFP στις κυψελίδες, στις εστίες δηλαδή της πνευμονικής βλάβης, ενώ τα RFP⁺ κύτταρα μειώνονται σε αριθμό και δεν εκφράζουν πια το δείκτη pro-SpC των πνευμονοκυττάρων, εκτός από ένα ποσοστό αυτών, τα οποία παρουσιάζουν υπερπλαστική εικόνα (Εικόνα 25α).

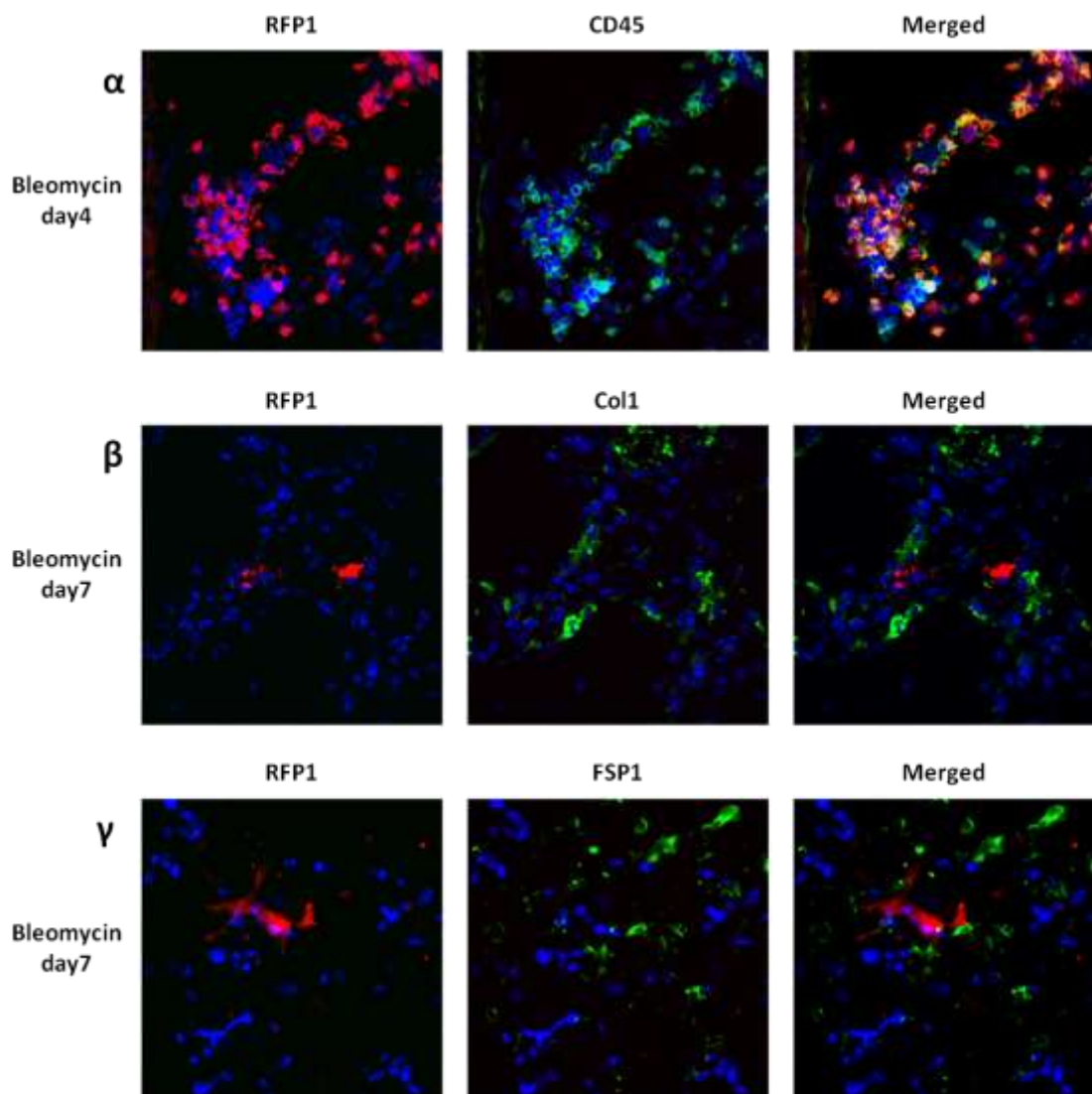
Λόγω της χαρακτηριστικής πεπλατυσμένης δομής που είχαν τα κύτταρα που εξέφραζαν τα διαγονίδια στις κυψελίδες του ινωτικού πνεύμονα, έγιναν χρώσεις έναντι του δείκτη T1α

των πνευμονοκυττάρων τύπου I (Εικόνα 25β) και έναντι του δείκτη αSMA (alpha Smooth Muscle Actin) των μυοϊνοβλαστών, όπως φαίνεται στην Εικόνα 25γ.

Από την ανάλυση της κατανομής των eGFP και RFP θετικών κυττάρων, μετά από χρώση του ιστού με T1α, φαίνεται ότι αν και τα κύτταρα που εκφράζουν τα διαγονίδια είναι αρνητικά για T1α, βρίσκονται στα όρια μεταξύ των υγιών ακόμα περιοχών που εκφράζουν T1α και των τραυματισμένων περιοχών που είναι T1α-αρνητικές. Αυτό το εύρημα οδηγεί στην υπόθεση ότι η ενεργοποίηση του TGF-β σηματοδοτικού μονοπατιού λαμβάνει χώρα στα σημεία του ιστού που δεν έχουν πλήρως τραυματιστεί, αλλά πιθανός βρίσκονται σε διεργασία ανταπόκρισης στη βλάβη.

Για να διερευνηθεί η υπόθεση ότι τα κύτταρα που εκφράζουν τα διαγονίδια έχουν χαρακτηριστικά ινοβλαστών (212), του κύριου δηλαδή κυτταρικού τύπου που συσσωρεύεται στον ιστό σε καταστάσεις ίνωσης, ακολούθησε χρώση για αSMA που εκφράζεται στους μυοϊνοβλάστες, τα επιθηλιακά δηλαδή κύτταρα που υφίστανται εξαλλαγή, από επιθηλιακά σε ινοβλάστες (213) (epithelial-mesenchymal transition, EMT). Από αυτήν τη χρώση φαίνεται ότι, αν και τα κύτταρα που εκφράζουν τα διαγονίδια εντοπίζονται σε περιοχές πλούσιες σε συσσώρευση αSMA θετικών κυττάρων, τα υπό μελέτη κύτταρα δεν εκφράζουν ή εκφράζουν ελάχιστα αυτόν το δείκτη, στα χρονικά σημεία που έγινε η ανάλυση των ιστών.

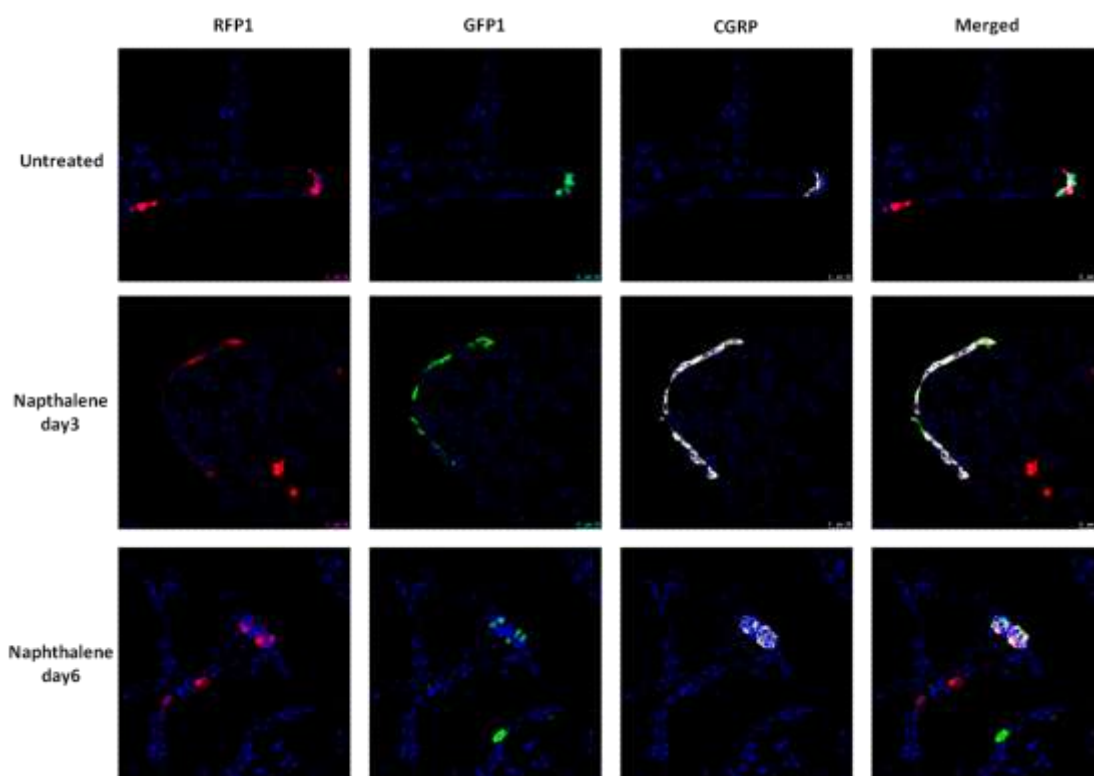
Λόγω του όγκου των μελετών που διασυνδέουν τη δράση του TGF-β με το φαινόμενο του EMT και την παραγωγή ινοβλαστών (214-216), πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από χρώσεις για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των RFP⁺ κυττάρων και την πιθανή διασύνδεσή τους με τους ινοβλάστες που εντοπίζονται στον τραυματισμένο πνεύμονα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 26β-γ, τα RFP⁺ κύτταρα δε συνεκφράζουν τους δείκτες των ινοβλαστών Col1 (Collagen1) και FSP1 (Fibroblast-Specific Protein 1), επιβεβαιώνοντας τα προηγούμενα ευρήματα ότι τα RFP⁺ κύτταρα δεν είναι ινοβλάστες. Αντιθέτως, ένα μεγάλο ποσοστό φλεγμονωδών κυττάρων (CD45 θετικά) που συσσωρεύονται στον τραυματισμένο ιστό, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια της βλάβης, είναι και RFP⁺ (Εικόνα 26α), υποδεικνύοντας τη συμμετοχή του TGF-β σηματοδοτικού μονοπατιού στην υποκείμενη φλεγμονή.



Εικόνα 26: Χαρακτηρισμός με ανοσοφθορισμό, των RFP⁺ κυττάρων, με τη χρήση αντισωμάτων έναντι των CD45, Col1, FSP1, στο μοντέλο πνευμονικής ίνωσης μετά από χορήγηση μπλεομυκίνης.

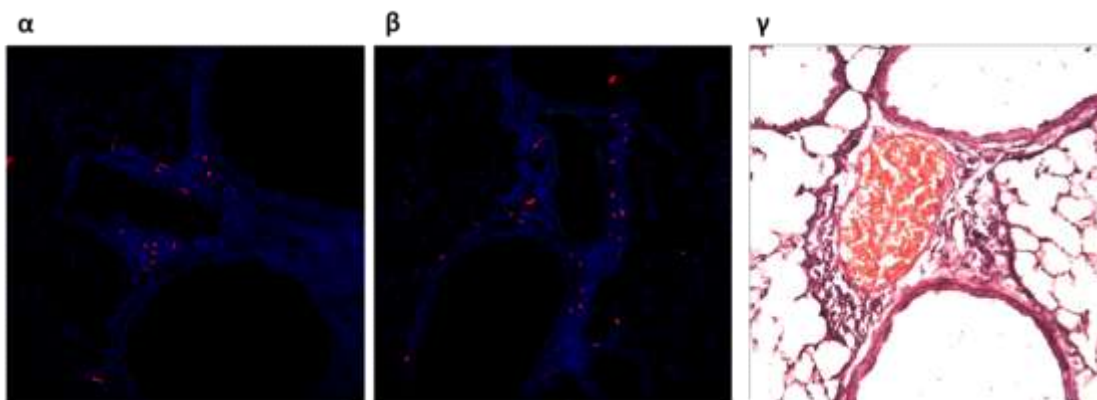
Χρησιμοποιώντας το μοντέλο της καταστροφής του πνευμονικού βρογχικού επιθηλίου μετά από συστηματική χορήγηση ναφθαλενίου, διαπιστώθηκε ότι και τα δυο διαγονίδια ενεργοποιούνται στα σημεία που εντοπίζονται τα νευροεπιθηλιακά σωματίδια (Εικόνα 27). Τα σημεία αυτά αποτελούν και την πηγή αναγέννησης του πνευμονικού βρογχικού επιθηλίου και χαρακτηρίζονται από την παρουσία των νευροεπιθηλιακών κυττάρων (CGRP θετικά κύτταρα). Η βλάβη του πνευμονικού επιθηλίου οδηγεί στην περιοδική υπερπλασία αυτής της περιοχής, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Clara που βρίσκονται εντός της ζώνης των σωματίων και τη σταδιακή αναγέννηση του επιθηλίου. Η ενεργοποίηση και των

δύο διαγονιδίων σε αυτές τις περιοχές υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή του σηματοδοτικού μονοπατιού της υπερ-οικογένειας του TGF- β στην παραπάνω διαδικασία.



Εικόνα 27: Χαρακτηριστικές χρώσεις με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του CGRP, των RFP και eGFP θετικών κυττάρων στο μοντέλο της καταστροφής του πνευμονικού βρογχικού επιθηλίου, μετά από συστηματική χορήγηση ναφθαλενίου.

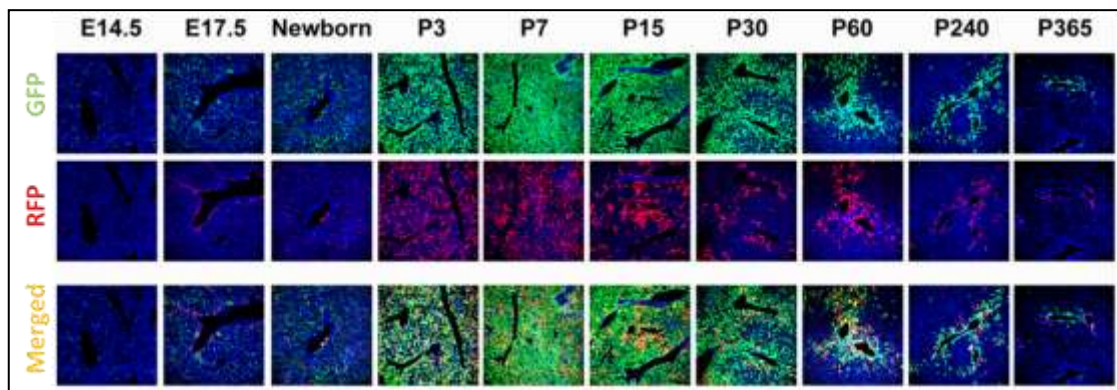
Τέλος, διερευνήθηκε η πιθανή ενεργοποίηση του RFP στο ζωικό μοντέλο πρόκλησης αλλεργικής φλεγμονής στους πνεύμονες μετά από ευαισθητοποίηση με οβαλβουμίνη, χρησιμοποιώντας τους TRE-RFP διαγονιδιακούς μύες. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 28α-β, εστιάζοντας στις φλεγμονώδεις εστίες που εντοπίζονται κυρίως πέριξ των αγγείων και των αεραγωγών του ιστού, εντοπίστηκαν φλεγμονώδη κύτταρα που είναι RFP θετικά. Στην Εικόνα 28γ φαίνεται μια αντιπροσωπευτική περιοχή από μια φλεγμονώδη εστία, μετά από χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη.



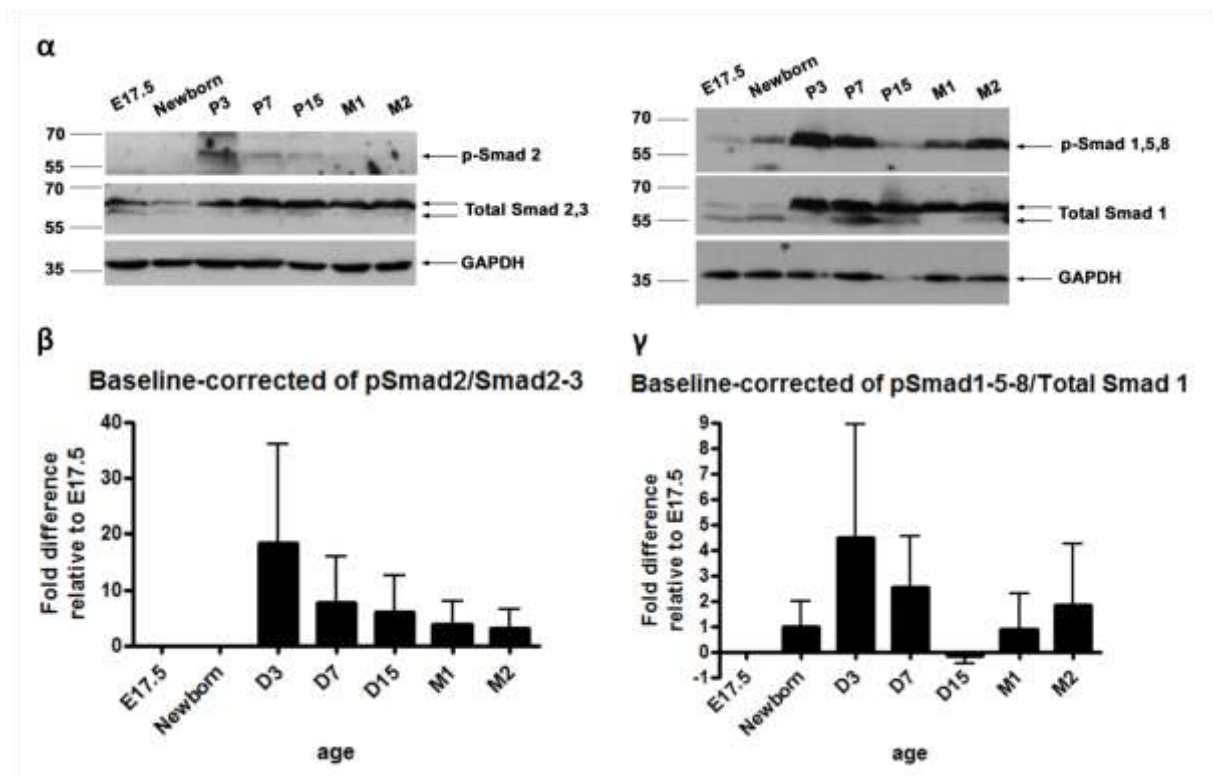
Εικόνα 28: Εντοπισμός με ανοσοφθορισμό, των RFP θετικών κυττάρων: (α,β) Στις φλεγμονώδεις εστίες, στο μοντέλο πρόκλησης αλλεργικής φλεγμονής στους πνεύμονες μετά από ευαισθητοποίηση με οβαλβουμίνη. γ) Εντοπισμός μιας φλεγμονώδους εστίας με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης.

5.11. Χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης των διαγονιδίων κατά την ανάπτυξη και ομοιόσταση του ήπατος των TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακών μυών.

Για το χαρακτηρισμό του χωροχρονικού προτύπου έκφρασης των διαγονιδίων κατά την ανάπτυξη του ήπατος, συνελέγησαν ιστοί από τους TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακούς μύες, κατά τις φάσεις της εμβρυϊκής ανάπτυξης E14.5 και E17.7, από νεογέννητους μύες και από μύες ηλικίας τριών [3], επτά [7], δεκαπέντε [15], τριάντα [30], εξήντα [60], και διακοσίων σαράντα [240] ημερών και από μύες ενός έτους. Με ανοσοφθορισμό έναντι των πρωτεϊνών eGFP και RFP (Εικόνα 29), φαίνεται ότι υπάρχει ισχυρή έκφραση και των δύο διαγονιδίων αμέσως μετά τη γέννηση, κατά τη φάση δηλαδή που ενεργοποιείται λειτουργικά πλήρως το ήπαρ, ενώ όσο ο οργανισμός ωριμάζει, η έκφραση των διαγονιδίων περιορίζεται σε συγκεκριμένες ιστικές ζώνες.



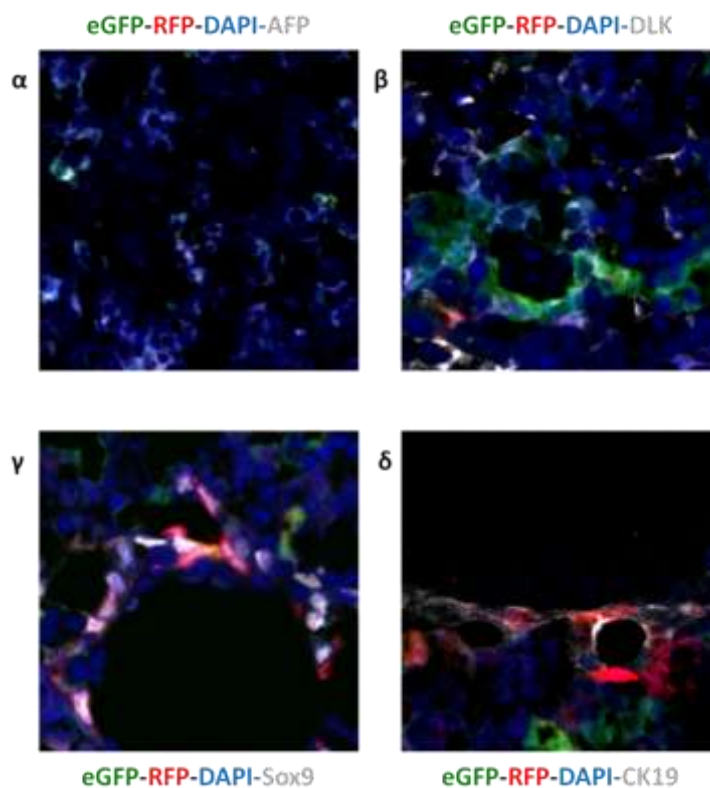
Εικόνα 29: Ανίχνευση της κατανομής των διαγονιδίων στους TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακούς μύες κατά την ανάπτυξη του ήπατος, με ανοσοφθορισμό.



Εικόνα 30: Προσδιορισμός των επιπέδων του pSmad2 και pSmad1-5-8 κατά την ανάπτυξη του ήπατος: α) Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western έναντι των pSmad2, pSmad1, ολικού Smad2-3, ολικού Smad1 και GAPDH, β) Ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων pSmad2/Ολικού Smad2-3, κανονικοποιημένα ως προς την ημέρα E17.5 γ) Ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων pSmad1-5-8/Ολικού Smad1, κανονικοποιημένα ως προς την ημέρα E17.5 (n=3).

Για να διερευνηθεί κατά πόσον οι αλλαγές στο πρότυπο έκφρασης των διαγονιδίων, συνάδουν με αντίστοιχες αλλαγές στο βαθμό ενεργοποίησης του ιστού από την υπερ-οικογένεια του TGF- β , προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των pSmad2 και pSmad1-5-8 με ανοσοσύπωμα κατά Western. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 30, το πρότυπο έκφρασης του RFP και GFP ακολουθούν την ίδια κινητική με τα επίπεδα των pSmad2 και pSma1-5-8 αντίστοιχα, και στον ιστό.

Ακολούθησαν χρώσεις ανοσοφθορισμού, για το χαρακτηρισμό των eGFP και RFP θετικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη του ήπατος.



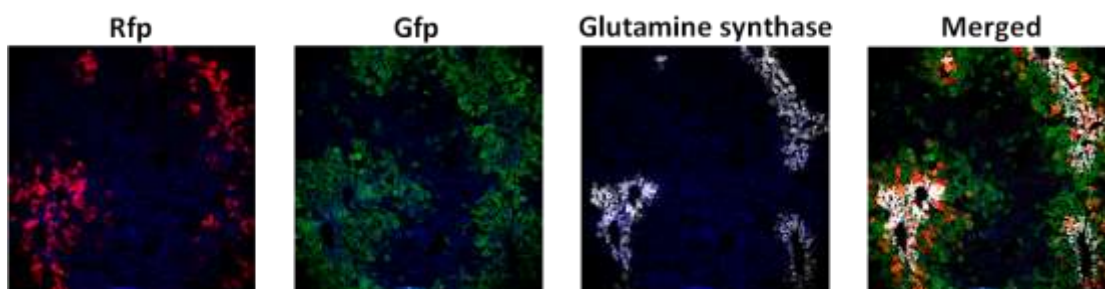
Εικόνα 31: Χαρακτηρισμός των eGFP και RFP θετικών κυττάρων του εμβρυϊκού ήπατος με ανοσοφθορισμό. Χαρακτηριστικές χρώσεις έναντι: α) Της α -φετοπρωτεΐνης (AFP), β) Της ομόλογης της πρωτεΐνης Δέλτα 1 (DLK1), γ) Του μεταγραφικού παράγοντα Sox9, και δ) Της κυτταροκερατίνης-19.

Για να διερευνηθεί εάν τα eGFP⁺ κύτταρα που εντοπίζονται στο παρέγχυμα του ήπατος στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης (E14.5-17.5), ανήκουν στην ηπατική σειρά, πραγματοποιήθηκαν χρώσεις έναντι δυο δεικτών που εκφράζονται από τους ηπατοβλάστες (πρώιμα ηπατοκύτταρα), της α -φετοπρωτεΐνης (AFP) και της ομόλογης της πρωτεΐνης Δέλτα

1 (Protein delta homolog 1, DLK1). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 31α-β, όλα τα eGFP⁺ κύτταρα κατά την εμβρυϊκή φάση της ανάπτυξης του ήπατος εκφράζουν και τους δύο αυτούς δείκτες, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι όλα τα eGFP⁺ κύτταρα που εντοπίζονται στο παρέγχυμα σε αυτήν τη φάση της ανάπτυξης είναι ηπατοβλάστες.

Ακολούθησε ο χαρακτηρισμός των RFP⁺ κυττάρων που εντοπίζονται πέριξ ορισμένων αγγείων του εμβρυϊκού ήπατος κατά το στάδιο E17.5. Έγιναν χρώσεις έναντι του μεταγραφικού παράγοντα Sox9, που σε αυτήν τη φάση της ανάπτυξης εκφράζεται από τα πρώιμα και ώριμα χοληφόρα αγγεία και έναντι της κυτταροκερατίνης-19 (CK19), που εκφράζεται από τα ώριμα χοληφόρα αγγεία. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 31γ-δ, τα RFP⁺ κύτταρα εκφράζουν Sox9, ενώ βρίσκονται και στις περιοχές όπου εντοπίζεται η έκφραση της CK19, υποδηλώνοντας την ενεργή συμμετοχή του TGF-β σηματοδοτικού μονοπατιού στην ανάπτυξη του δικτύου των χοληφόρων αγγείων του ήπατος.

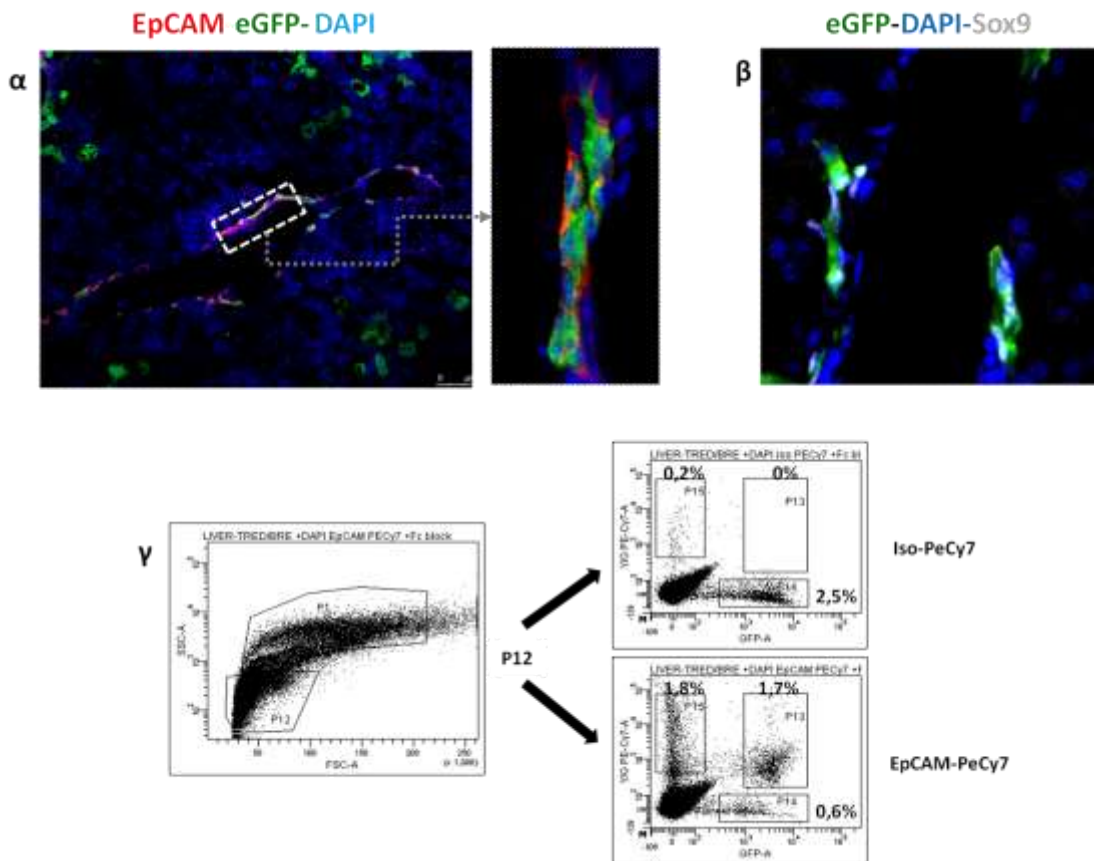
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 32, κατά τη φάση της ωρίμανσης του οργανισμού, η έκφραση των διαγονιδίων περιορίζεται σε συγκεκριμένες ζώνες του ιστού. Για το χαρακτηρισμό αυτών των ζωνών, πραγματοποιήθηκε χρώση έναντι του ενζύμου συνθετάση της γλουταμίνης (Glutamine Synthase, GS), το οποίο εκφράζεται από μια ζώνη 1-2 κυττάρων πέριξ των κλάδων της κεντρικής φλέβας. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 32, τα eGFP και RFP θετικά κύτταρα εντοπίζονται σε ζώνες γύρω από αυτούς τους κλάδους της κεντρικής φλέβας, με τη ζώνη των eGFP⁺ κυττάρων να είναι πιο εκτεταμένη και τη ζώνη των RFP⁺ και eGFP-RFP διπλά θετικών ηπατοκυττάρων, πιο περιορισμένη.



Εικόνα 32: Χαρακτηρισμός της ζώνης εντοπισμού των eGFP και RFP θετικών κυττάρων του ενήλικου ήπατος, με χρώση έναντι της συνθετάσης της γλουταμίνης (Glutamine Synthase).

Στο ενήλικο ήπαρ, εκτός από την έκφραση των διαγονιδίων από τα ηπατοκύτταρα που εντοπίζονται πέριξ της κεντρικής φλέβας, eGFP⁺ (και πολύ λίγα RFP⁺) κύτταρα με επίμηκες

σχήμα, εντοπίζονται και στο στρώμα που περιβάλλει τους κλάδους της πυλαίας φλέβας. Για το χαρακτηρισμό αυτών των κύτταρων, ακολούθησε χρώση έναντι του δείκτη των ηπατικών βλαστικών κύτταρων EpCAM (Εικόνα 33α) και του μεταγραφικού παράγοντα Sox9, που σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο εκφράζεται από τα ηπατικά βλαστικά κύτταρα (Εικόνα 33β). Και οι δύο δείκτες συνεκφράζονται από τα eGFP⁺ κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα κύτταρα έχουν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ηπατικών βλαστικών κυττάρων.



Εικόνα 33: Χαρακτηρισμός των eGFP⁺ κυττάρων του ενήλικου ήπατος, με χρώσεις έναντι: α) Του δείκτη των ηπατικών βλαστικών κυττάρων EpCAM, β) Του μεταγραφικού παράγοντα Sox9. (γ) Προσδιορισμός του ποσοστού των EpCAM⁺ κυττάρων που εκφράζουν eGFP, με κυτταρομετρία ροής. Από το σύνολο των κυττάρων, επελέγησαν με βάση τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά, τα κύτταρα (P12) που δε χαρακτηρίζονται ως ηπατοκύτταρα και ακολούθησε χρώση με το αντίσωμα έναντι του EpCAM ή το ιστοτυπικό αντίσωμα.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των eGFP⁺ κυττάρων που είναι θετικά και για το δείκτη EpCAM, ακολούθησε ενζυμική πέψη του ενήλικου ήπατος και στο ελαιώδη μεμονωμένων κυττάρων που προέκυψε, έγινε χρώση για EpCAM. Κατόπιν, προσδιορίστηκε

το ποσοστό των ErCAM⁺eGFP⁺ κυττάρων, με κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 33γ). Από την ανάλυση αυτή φαίνεται ότι περίπου το 50% των ErCAM⁺ κυττάρων, είναι και eGFP⁺.

5.12. Έκφραση των διαγονιδίων σε ζωικά μοντέλα ηπατικής βλάβης

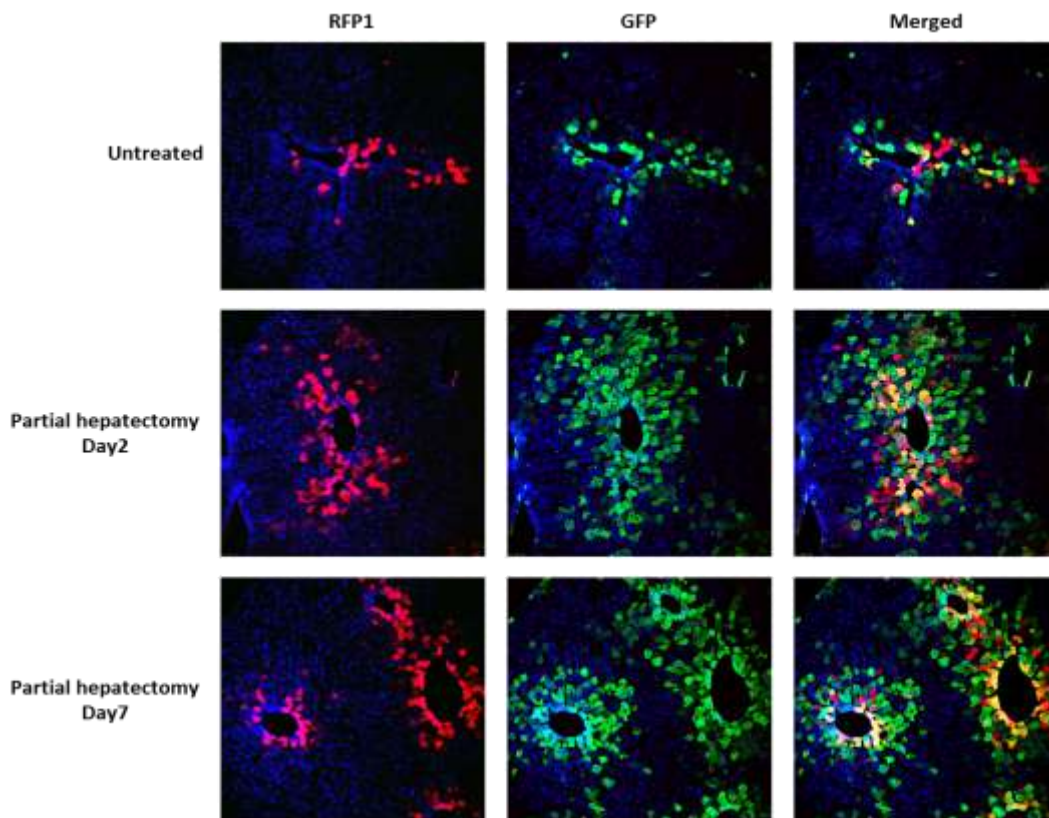
Για να μελετηθεί ο ρόλος των μελών της υπερ-οικογένειας του TGF-β σε παθολογικές καταστάσεις ηπατικής βλάβης, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ζωικά μοντέλα:

- i) Το μοντέλο πρόκλησης ηπατικής βλάβης και επακόλουθης αναδόμησης, μετά από τη χειρουργική αφαίρεση των 2/3 του ηπατικού ιστού, με τη χρήση των TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακών μυών.
- ii) Το μοντέλο ηπατικής βλάβης μετά από εικοσιτετράωρη στέρηση τροφής, με τη χρήση των TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακών μυών.
- iii) Το μοντέλο της οξείας ηπατικής βλάβης, μετά από συστηματική χορήγηση Κονκαναβαλίνης A (ConA), με τη χρήση των TRE-RFP διαγονιδιακών μυών.

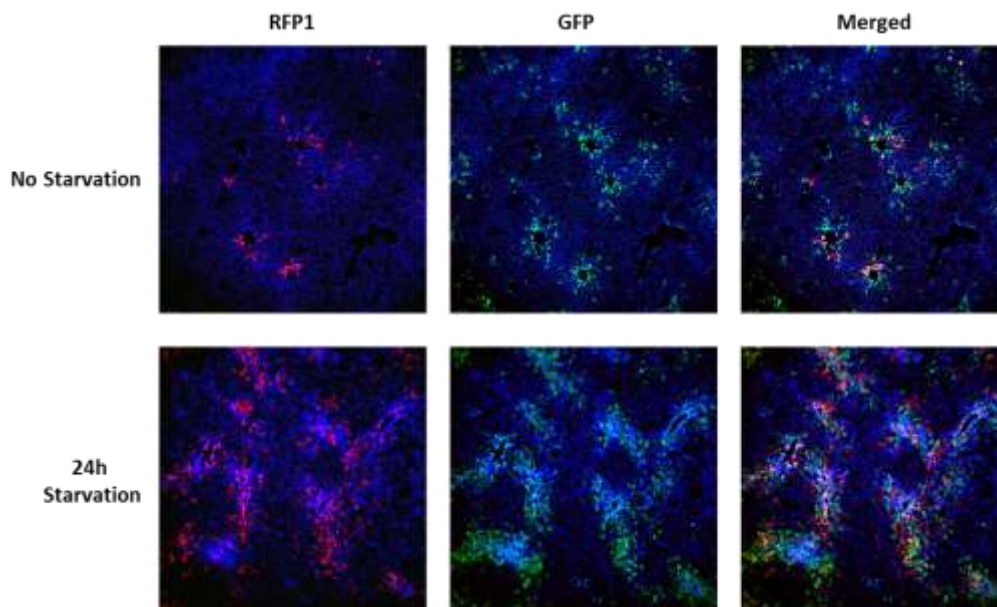
Και σε αυτές τις περιπτώσεις, αυτό που επιχειρήθηκε ήταν η αδρή καταγραφή της έκφρασης των διαγονιδίων, ούτως ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή εμπλοκή του TGF-β σηματοδοτικού μονοπατιού στην παθοφυσιολογία του ήπατος.

Η χειρουργική αφαίρεση των 2/3 του ηπατικού ιστού οδηγεί σε ταχεία αύξηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των ηπατοκυττάρων, σε μια προσπάθεια αναπλήρωσης της χαμένης ιστικής μάζας. Αναλύοντας το ήπαρ σε δυο χρονικά σημεία της ηπατικής αναδόμησης (Εικόνα 34) , παρατηρήθηκε αύξηση του εύρους της ζώνης των RFP και eGFP θετικών κυττάρων, γύρω από τους κλάδους της κεντρικής φλέβας. Η αύξηση αυτή παρέμεινε σταθερή και στα δύο χρονικά σημεία που αναλύθηκαν.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε το πρότυπο έκφρασης και κατανομής των RFP και eGFP θετικών ηπατοκυττάρων, μετά από εικοσιτετράωρη αποχή από το φαγητό (24h Starvation). Και σε αυτήν την περίπτωση, διαπιστώθηκε έντονη αύξηση του εύρους της ζώνης των RFP και eGFP θετικών κυττάρων, γύρω από τους κλάδους της κεντρικής φλέβας, όπως φαίνεται στην Εικόνα 35.

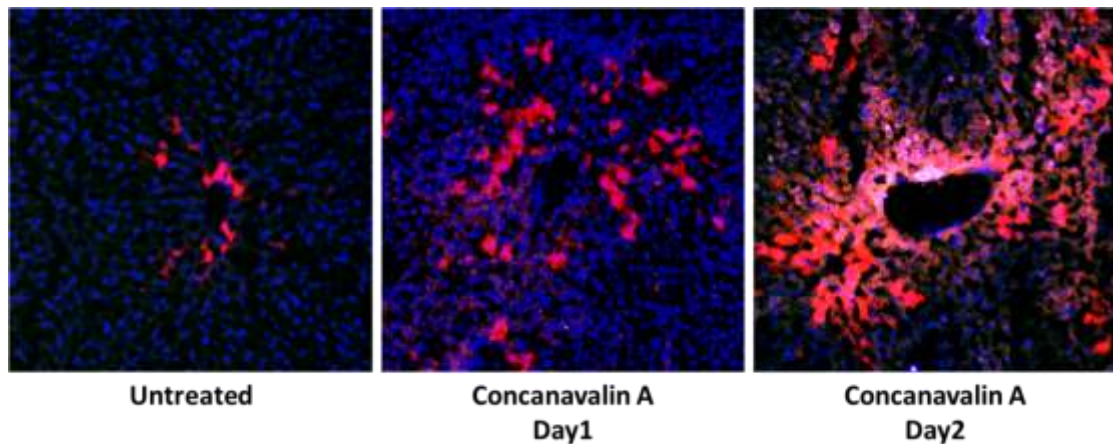


Εικόνα 34: Κατανομή των RFP και eGFP θετικών κυττάρων, στο μοντέλο πρόκλησης ηπατικής βλάβης και αναδόμησης μετά από τη χειρουργική αφαίρεση των 2/3 του ηπατικού ιστού, με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού.



Εικόνα 35: Κατανομή των RFP και eGFP θετικών κυττάρων, στο μοντέλο πρόκλησης ηπατικής βλάβης μετά από εικοσιτετράωρη στέρηση τροφής, με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο της οξείας ηπατικής βλάβης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση Κονκαναβαλίνης Α. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 36, και σε αυτήν την περίπτωση, ο τραυματισμός του ηπατικού ιστού οδήγησε σε έντονη αύξηση του εύρους της ζώνης των RFP⁺ κυττάρων, γύρω από τους κλάδους της κεντρικής φλέβας.



Εικόνα 36: Κατανομή των RFP⁺ κυττάρων στο μοντέλο πρόκλησης οξείας ηπατικής βλάβης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση Κονκαναβαλίνης-Α, με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού.

Από τη χρήση των παραπάνω μοντέλων πρόκλησης βλάβης του ηπατικού ιστού, μπορεί κάποιος να εξάγει το συμπέρασμα ότι οποτεδήποτε διαταράσσεται η ομοιοστατική ισορροπία του οργάνου, το σύστημα, ανταποκρινόμενο στη βλάβη, επάγει την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της υπερ-οικογένειας του TGF-β στα ηπατοκύτταρα που εντοπίζονται στις ίδιες ανατομικές περιοχές του οργάνου. Τα ευρήματα αυτά μπορεί να αποτελέσουν τη βάση για πιο λεπτομερή χαρακτηρισμό του ρόλου της υπερ-οικογένειας του TGF-β στην ομοιόσταση και παθοφυσιολογία του ήπατος.

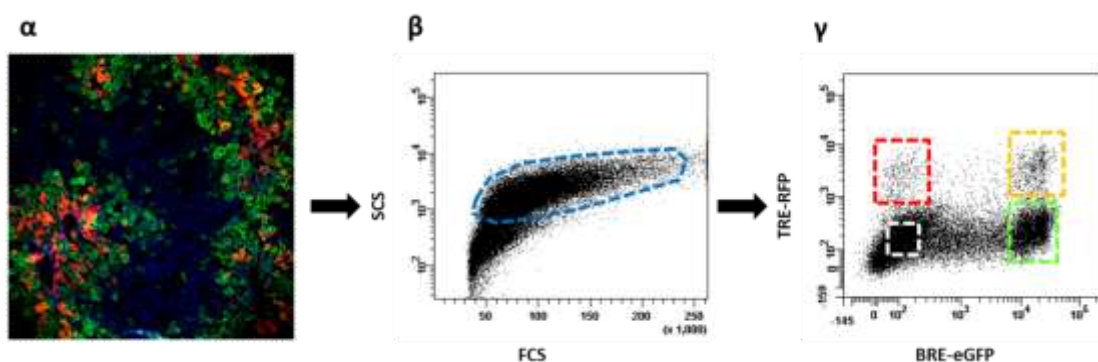
5.13. Μεταγραφική ανάλυση των ηπατοκυττάρων που εκφράζουν τα διαγονίδια

Για να επιτευχθεί η ενδεδειγμένη μοριακή ανάλυση των κυτταρικών πληθυσμών που εκφράζουν τα δύο διαγονίδια, επιλέγει η διαδικασία της ανάλυσης του μεταγραφώματος (transcriptome) με τη μέθοδο της επόμενης γενεάς αλληλούχησης (Next Generation Sequencing), ή αλλιώς RNA-Seq (217). Με τη συγκεκριμένη τεχνολογική πλατφόρμα μπορεί να επιτευχθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός των RNA μεταγράφων των δειγμάτων, με πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια και σε μεγαλύτερο βάθος ανάλυσης, συγκριτικά με τις υπόλοιπες

πλατφόρμες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των RNA μεταγράφων (218), όπως η πλατφόρμα που βασίζεται στη χρήση μικροσυστοιχιών υβριδισμού (microarrays).

Για να επιτευχθεί αυτό, επελέγη το ήπαρ ως όργανο προς ανάλυση, λόγω της απλότητάς του όσον αφορά τους κυτταρικούς πληθυσμούς που το συνθέτουν, μιας και πάνω από το 70% του οργάνου αποτελείται από ηπατοκύτταρα. Η επιλογή αυτή κρίθηκε απαραίτητη γιατί επέτρεψε την απομόνωση επαρκούς αριθμού κυττάρων με τη μέθοδο του κυτταροδιαχωρισμού, ώστε να εξαχθεί η κατάλληλη ποσότητα mRNA για την περαιτέρω ανάλυση. Αντιθέτως, όργανα όπως ο πνεύμονας, αποτελούνται από περίπου σαράντα διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (219), καθιστώντας έτσι την ανάλυσή του με αυτήν την προσέγγιση εξαιρετικά δύσκολη.

Για την απομόνωση των ηπατοκυττάρων που είναι $eGFP^+$, RFP^+ , $eGFP^+RFP^+$ και $eGFP^-RFP^-$, πραγματοποιήθηκε ενζυμική πέψη του ήπατος και λήψη των ηπατοκυττάρων, τα οποία και απομονώθηκαν με τη χρήση κυτταροδιαχωριστή, όπως φαίνεται στην Εικόνα 37. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί μύες ηλικίας δύο μηνών.



Εικόνα 37: Απομόνωση των πληθυσμών των ηπατοκυττάρων που εκφράζουν τα διαγονίδια, με τη χρήση κυτταροδιαχωρισμού: α) Αντιπροσωπευτική εικόνα του ιστού πριν την ενζυμική πέψη, β) Χαρακτηριστικό στικτόγραμμα πρόσθιου και πλάγιου σκεδασμού, όπου διακρίνεται ο πληθυσμός των ηπατοκυττάρων (μπλε κύκλος), γ) Χαρακτηριστικό στικτόγραμμα κατανομής των $eGFP$ - RFP θετικών κυττάρων, όπου φαίνονται τα παράθυρα διαχωρισμού των $eGFP^+$ (πράσινο τετράγωνο), RFP^+ (κόκκινο τετράγωνο), $eGFP^+RFP^+$ (κίτρινο τετράγωνο) και $eGFP^-RFP^-$ (άσπρο τετράγωνο), κυτταρικών πληθυσμών.

Για κάθε κυτταρικό πληθυσμό έγινε συλλογή και ανάλυση τριών [3] ανεξάρτητων δειγμάτων και το κάθε δείγμα προήλθε από το συνδυασμό των κυττάρων που απομονώθηκαν με κυτταροδιαχωρισμό, από τρία [3] ανεξάρτητα πειράματα (ένας μύς ανά πείραμα). Ο

αριθμός των ηπατοκυττάρων ανά δείγμα που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση με RNA-Seq, φαίνεται στον Πίνακα 9.

	Group1	Group2	Group3
RFP+	105254	112000	64518
GFP+	202523	211000	265572
RFP+GFP+	86788	82000	56555
RFP-GFP-	181520	428000	277887

Πίνακας 9: Ο αριθμός των ηπατοκυττάρων ανά δείγμα, που χρησιμοποιήθηκαν στη μεταφραστική ανάλυση.

Sample	Sample ID	Nucleic Acid Conc. (ng/μl)	Total RNA (ng in 12 μl)
RFP1	1	93	1116
GFP1	2	192,7	2312
Double1	3	63,5	762
Negative1	4	144,1	1729
RFP2	5	163,1	1957
GFP2	6	607,4	7289
Double2	7	181,3	2176
Negative2	8	672	8064
RFP3	9	51,4	617
GFP3	10	331,3	3976
Double3	11	48	576
Negative3	12	97,3	1168

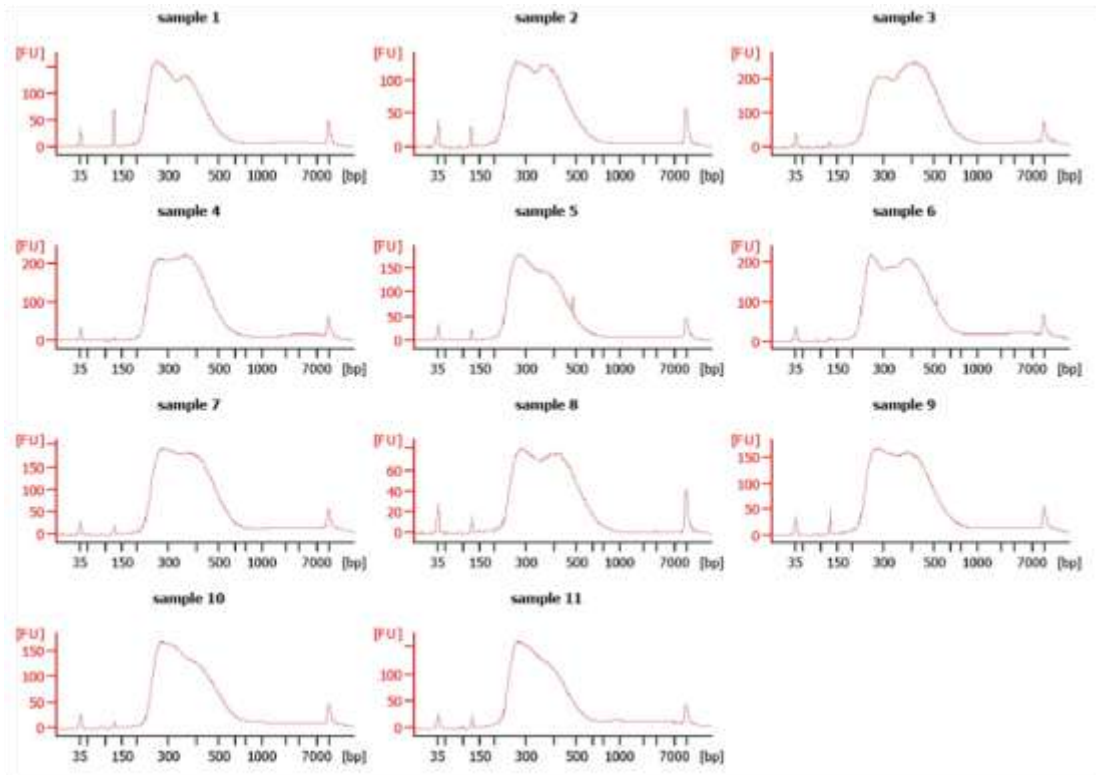
Πίνακας 10: Ο κωδικός αριθμός, η συγκέντρωση και η συνολική ποσότητα RNA ανά δείγμα, που χρησιμοποιήθηκε στη μεταφραστική ανάλυση.

Ακολούθησε η απομόνωση ολικού RNA με το RNAeasy kit της εταιρίας Qiagen και η ποσότητα που απομονώθηκε προσδιορίστηκε φωτομετρικά με τη χρήση της συσκευής Nanodrop 2000. Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης φαίνονται στον Πίνακα 10.

Κατόπιν, συντέθηκαν οι cDNA βιβλιοθήκες με τη χρήση του TruSeq RNA Sample Preparation Kit της εταιρίας Illumina. Για τη σύνθεση των βιβλιοθηκών, χρησιμοποιήθηκαν 500ng ολικού RNA από κάθε δείγμα. Σε κάθε μια από τις δώδεκα [12] βιβλιοθήκες που συντέθηκαν, προστέθηκε και ένας ιχνηθέτης (adaptor) σε όλα τα cDNA μετάγραφα αυτής, ο κωδικός του οποίου φαίνεται στον Πίνακα 10 (sample ID). Η ιχνηθέτηση των βιβλιοθηκών επέτρεψε την ανάμειξη (multiplexing) και των δώδεκα [12] δειγμάτων σε ένα [1], έτσι ώστε να αναλυθούν ταυτόχρονα σε μια υποδοχή της συσκευής αλληλούχισης. Η ανάμειξη των δειγμάτων οδηγεί σε μείωση του κόστους αλλά και των τυχόν διαφορών στην ποιότητα αλληλούχισης, που μπορεί να προκύψουν εάν τα δείγματα αναλυθούν σε διαφορετικές υποδοχές της συσκευής.

Για να προσδιοριστεί η ποιότητα των βιβλιοθηκών cDNA που παρήχθησαν, έγινε ανάλυση αυτών με τη χρήση του Agilent High Sensitivity DNA Kit της εταιρίας Agilent. Με αυτήν τη μέθοδο, καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός του εύρους και της κατανομής του μεγέθους των cDNA μεταγράφων από κάθε βιβλιοθήκη, καθώς επίσης και ο ποσοτικός προσδιορισμός αυτών. Μια καλή βιβλιοθήκη αποτελείται από cDNA μετάγραφα μεγέθους 200-700 βάσεων, επιτρέποντας έτσι την πλήρη αλληλούχισή τους. Στην Εικόνα 38 φαίνονται τα αποτελέσματα από αυτήν την ανάλυση, κατά την οποία επιβεβαιώθηκε η καλή ποιότητα των παραγομένων βιβλιοθηκών cDNA.

Η ανάμειξη (multiplexing) των βιβλιοθηκών γίνεται με την προσθήκη ισομοριακής ποσότητας από κάθε βιβλιοθήκη. Για να προσδιοριστεί η τελική ποσότητα των παραγομένων βιβλιοθηκών, ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιώντας, για την ποσοτικοποίηση, αραιώσεις (200pM, 20pM, 2pM, 0.2pM) μιας βιβλιοθήκης μάρτυρα που είναι εμπορικά διαθέσιμη.



Εικόνα 38: Σχηματική απεικόνιση της κατανομής μεγέθους των μεταγράφων cDNA στις παραγόμενες βιβλιοθήκες.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των βιβλιοθηκών έγινε ακλουθώντας τον παρακάτω τύπο:

$$C_{\text{βιβλιοθήκης}} = C_{\text{βιβλιοθήκης από qPCR}} \times \left(\frac{\text{Μέσο μέγεθος βιβλιοθήκης-μάρτυρα}}{\text{Μέσο μέγεθος βιβλιοθήκης-δείγματος}} \right) \times \text{αραίωση}$$

Τα αποτελέσματα αυτού του προσδιορισμού συνοψίζονται στον Πίνακα 11, όπου φαίνεται ότι η τελική συγκέντρωση του προϊόντος που προήλθε από την ανάμειξη των δώδεκα [12] επιμέρους βιβλιοθηκών, ήταν 176.7nM.

Ακολούθησε η ανάλυση των δειγμάτων με τη χρήση της συσκευής αλληλούχισης Illumina HiSeq. Η συγκεκριμένη ανάλυση έγινε στη μονάδα παροχής υπηρεσιών γενωμικής του European Molecular Biology Laboratory (EMBL), με έδρα τη Χαϊδελβέργη της Γερμανίας. Για την ανάλυση αυτή και την εξαγωγή των αποτελεσμάτων, ακολουθήθηκε μια σειρά διαδικασιών. Μετά την ανάμειξη (multiplexing) των επιμέρους βιβλιοθηκών και την αλληλούχισή τους από τη συσκευή αλληλούχισης, πραγματοποιήθηκε αντιστοίχιση των αποτελεσμάτων σε μια γενωμική βάση αναφοράς, η οποία στη συγκεκριμένη περίπτωση

ήταν η βάση αναφοράς για το μυ (*mus musculus*), και με τη χρήση του πακέτου ανάλυσης DESeq (220), πραγματοποιήθηκε η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και ο προσδιορισμός των επιπέδων διαφορικής έκφρασης μεταξύ των υπό ανάλυση πληθυσμών.

sample ID	unnormalized conc (nM)	normalized concentration (nM)	least concentrated sample times total microliters	μl per sample for pool	pooled library concentration
1	147.5	144.6078431		2.681355932	
2	895.5	877.9411765		0.441652708	
3	154.5	151.4705882		2.55987055	
4	188.5	184.8039216		2.098143236	
5	113	110.7843137	387.745098	3.5	
6	188.5	184.8039216		2.098143236	
7	222	217.6470588		1.781531531	
8	675	661.7647059		0.585925926	
9	163	159.8039216		2.426380368	
10	161	157.8431373		2.456521739	
11	174	170.5882353		2.272988506	
12	115.5	113.2352941		3.424242424	
				26.32675615	176.7381119

Πίνακας 11: Ο κωδικός αριθμός, η αρχική και ομαλοποιημένη συγκέντρωση, η ποσότητα που απαιτήθηκε ανά δείγμα και η συγκέντρωση του τελικού προϊόντος της ανάμειξης των δειγμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση RNA-Seq.

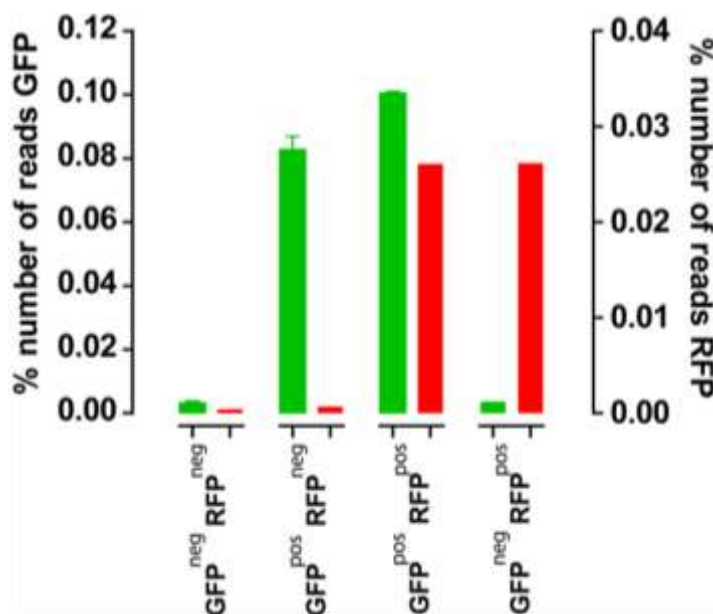
Από τα αποτελέσματα της διαφορικής έκφρασης, επελέγησαν τα μετάγραφα που εκπλήρωναν μια σειρά κριτηρίων, για περαιτέρω ανάλυση. Το πρώτο κριτήριο ήταν ο αριθμός των επαναλήψεων κάθε μετάγραφου ανά βιβλιοθήκη (baseMean). Για να αποκλειστεί η επιλογή αποτελεσμάτων που μπορεί να προήλθαν από τον «τυχαίο θόρυβο» της αλληλούχισης, επελέγησαν μετάγραφα με baseMean > 2. Κατά δεύτερον, επελέγησαν μόνο τα μετάγραφα που αντιστοιχούν σε γνωστά γονίδια της γενωμικής βάσης αναφοράς. Κατά τρίτον, επελέγησαν μόνον τα αποτελέσματα της διαφορικής έκφρασης που είχαν στατιστική σημαντικότητα $p\text{-value} < 0,05$.

Τα αποτελέσματα αυτής της επεξεργασίας, που αποτυπώνουν τις διαφορικές εκφράσεις των μεταγράφων των υπό μελέτη πληθυσμών, απεικονίζονται στο Παράρτημα Ι.

5.13.1. Προσδιορισμός της ποιότητας των cDNA βιβλιοθηκών και της RNA-Seq ανάλυσης

Για να διερευνηθεί η ποιότητα της όλης διαδικασίας, η οποία περιλαμβάνει την απομόνωση των υπό μελέτη πληθυσμών με τη χρήση κυτταροδιαχωριστή, τη σύνθεση των cDNA βιβλιοθηκών και την αλληλούχισή τους με τη μέθοδο RNA-Seq, έγινε προσδιορισμός των επαναλήψεων των RFP και eGFP μεταγράφων, στους υπό μελέτη πληθυσμούς.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 39, στον πληθυσμό των ηπατοκυττάρων που ήταν αρνητικά και για τα δυο διαγονίδια ($RFP^{neg}eGFP^{neg}$), δεν ανιχνεύτηκαν RFP και GFP μετάγραφα, στον $eGFP^+$ πληθυσμό ($eGFP^{pos}$), ανιχνεύτηκαν μόνο eGFP μετάγραφα, στον RFP^+ πληθυσμό (RFP^{pos}), ανιχνεύτηκαν μόνο RFP μετάγραφα, ενώ στον πληθυσμό που ήταν eGFP και RFP θετικός ($RFP^{pos}eGFP^{pos}$), ανιχνευτήκαν και τα δύο μετάγραφα. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει και την καλή ποιότητα της όλης διαδικασίας που προηγήθηκε, έως και την εξαγωγή των αποτελεσμάτων της RNA-Seq αλληλούχισης.

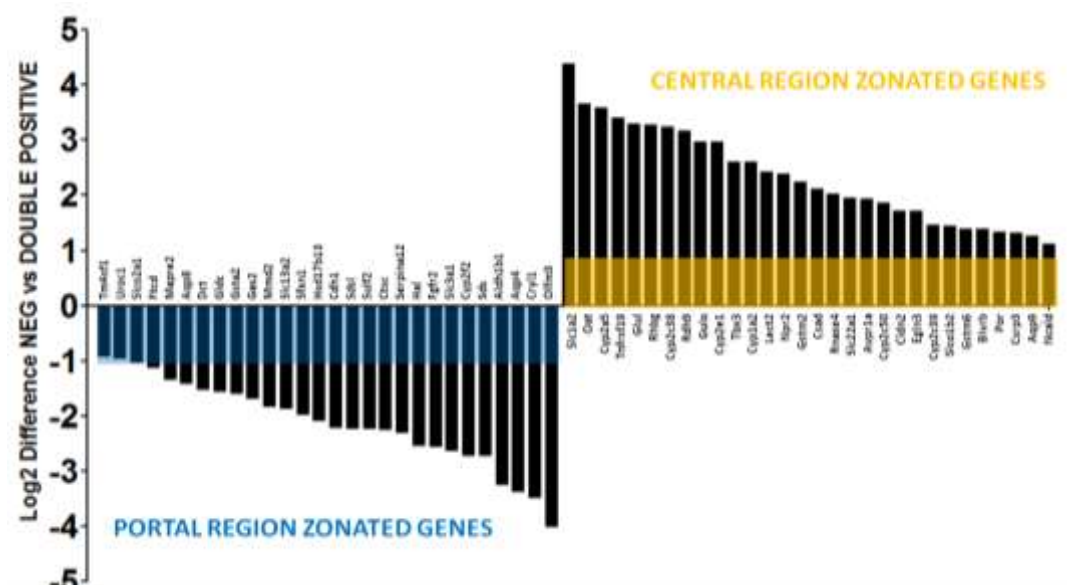


Εικόνα 39: Σχετική έκφραση των RFP και eGFP μεταγράφων, υπολογιζόμενα επί τις εκατό, επί του συνόλου των μεταγράφων κάθε βιβλιοθήκης, στους υπό μελέτη πληθυσμούς ηπατοκυττάρων.

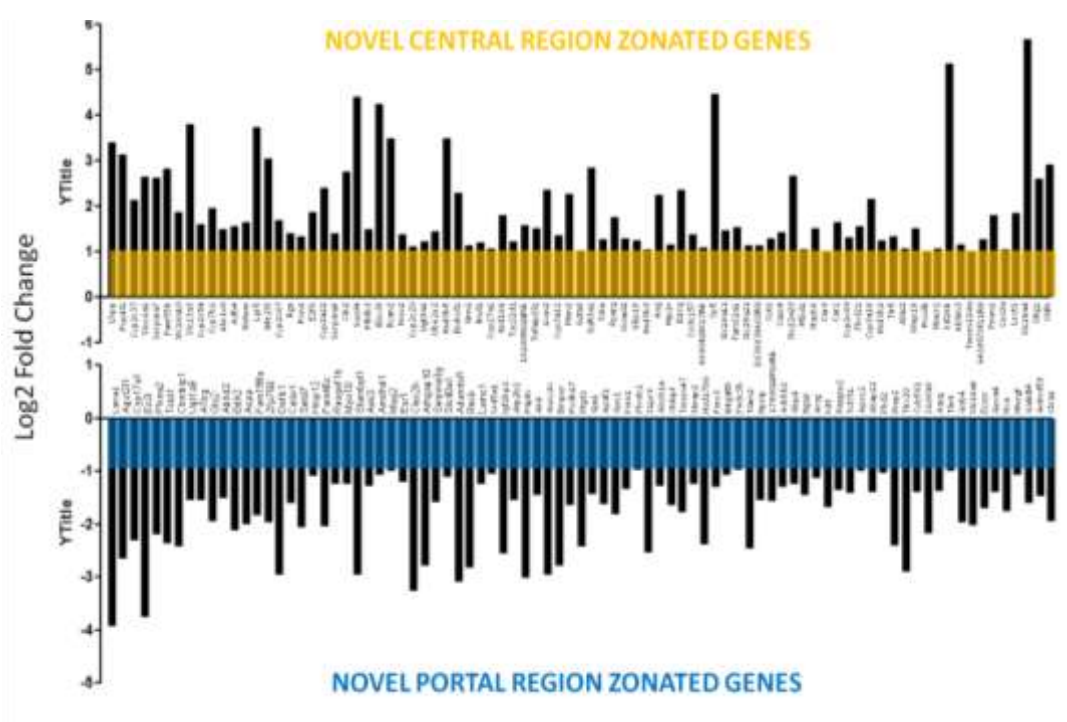
5.13.2. Συσχέτιση των αποτελεσμάτων της μεταγραφικής ανάλυσης με προηγούμενες αναλύσεις. Ανίχνευση νέων γονιδίων που εκφράζονται σε διακριτές περιοχές του ήπατος

Για να ενισχυθεί η αξιοπιστία της όλης διαδικασίας, συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα από τη διαφορική ανάλυση των υπό μελέτη πληθυσμών με την RNA-Seq τεχνολογία, με τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης (221). Στην τελευταία, απομονώθηκαν ηπατοκύτταρα που προήλθαν κυρίως από την περιοχή πέριξ της κεντρικής φλέβας του ήπατος και ηπατοκύτταρα που προήλθαν κυρίως από την περιοχή πέριξ της πυλαίας φλέβας και αναλύθηκε το γονιδιακό πρότυπο έκφρασής τους με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών υβριδισμού (microarrays). Επειδή στην παρούσα μελέτη, τα ηπατοκύτταρα που εκφράζουν τα διαγονίδια εδράζονται πέριξ της κεντρικής φλέβας στο ενήλικο ήπαρ, ελέγχθηκε αν το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης αυτών των πληθυσμών συνάδει με το αντίστοιχο πρότυπο έκφρασης των ηπατοκυττάρων που προήλθαν κυρίως από την περιοχή πέριξ της κεντρικής φλέβας του ήπατος, της προηγούμενης μελέτης (221). Με παρόμοιο τρόπο ελέγχθηκε το γονιδιακό πρότυπο έκφρασης των πληθυσμών της μελέτης μας που δεν εκφράζουν τα διαγονίδια και που εδράζονται πέριξ της πυλαίας φλέβας.

Από τη σύγκριση αυτή φαίνεται η ταύτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο μελετών (Εικόνα 40 και Παράρτημα II) και επιβεβαιώνονται τα προηγούμενα ευρήματα σχετικά με τα γονίδια, η έκφραση των οποίων εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή πέριξ της κεντρικής φλέβας του ήπατος και τα γονίδια, η έκφραση των οποίων εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή πέριξ της πυλαίας φλέβας του ήπατος.



Εικόνα 40: Σχηματική απεικόνιση των γονιδίων που και στις δυο μελέτες εκφράζονται στις ίδιες περιοχές του ήπατος (ηπατική φλέβα-central region, πυλαία φλέβα-portal region).

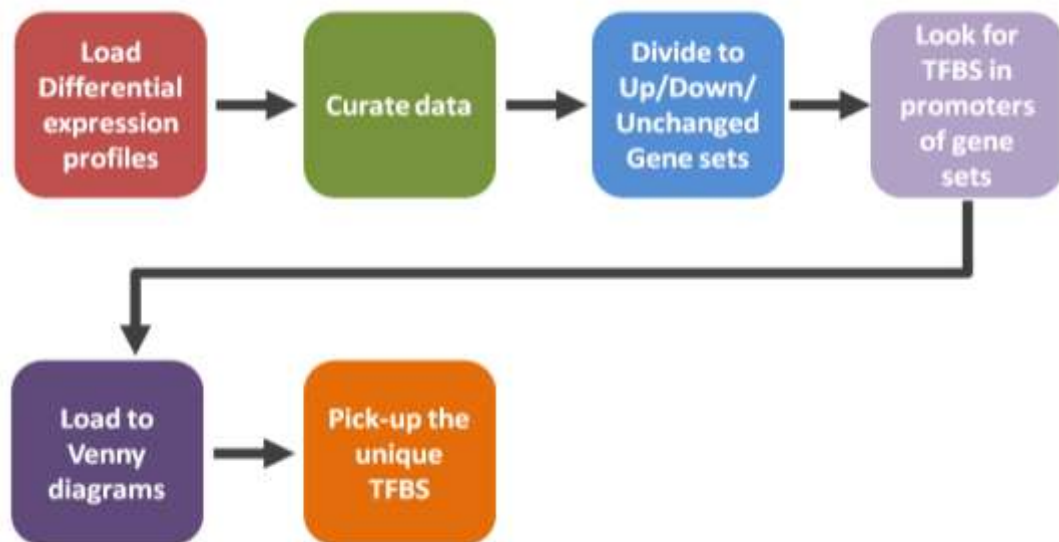


Η ανάλυση του γονιδιακού προτύπου έκφρασης των υπό μελέτη πληθυσμών με την τεχνολογία RNA-Seq, επέτρεψε τη λεπτομερή διερεύνηση γονιδίων, των οποίων η έκφραση εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε διακριτές περιοχές του ήπατος και πιο συγκεκριμένα στη ζώνη γύρω από την κεντρική φλέβα και τη ζώνη γύρω από την πυλαία φλέβα (Εικόνα 41 και Παράρτημα III), διευρύνοντας έτσι κατά πολύ τη γνώση που υπήρχε σχετικά με την παρουσία και πιθανώς τη λειτουργία αυτών των γονιδίων στο ήπαρ.

5.13.3. Βιοπληροφορική ανάλυση μοτίβων μεταγραφικών παραγόντων επί των αποτελεσμάτων της μεταγραφικής ανάλυσης

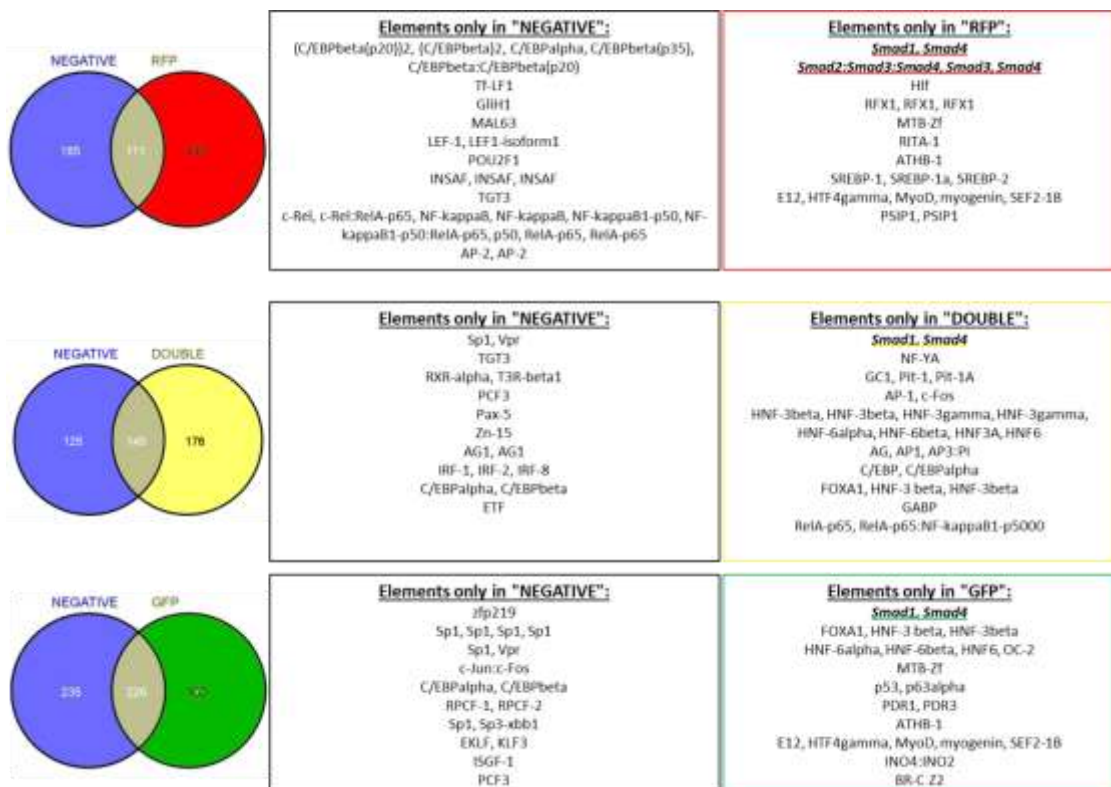
Βάσει των αποτελεσμάτων της διαφορικής γονιδιακής ανάλυσης των υπό μελέτη πληθυσμών των ηπατοκυττάρων, επιχειρήθηκε η βιοπληροφορική επεξεργασία αυτών, με σκοπό να διερευνηθεί η πιθανή εμπλοκή του σηματοδοτικού μονοπατιού της υπερ-οικογένειας του TGF-β στο γονιδιακό πρότυπο έκφρασης των ηπατοκυττάρων.

Για να επιτευχθεί αυτό, έγινε χρήση του συστήματος βιοπληροφορικής ανάλυσης ExPlain™ της εταιρίας BIOBASE.



Εικόνα 42: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την ανάλυση των μοναδικών νουκλεοτιδικών μοτίβων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, στους υπό ανάλυση πληθυσμούς.

Βάσει αυτού του συστήματος και για να διερευνηθούν οι μεταγραφικοί παράγοντες που μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση των υπό μελέτη πληθυσμών, ακολουθήθηκε η σειρά των διαδικασιών που φαίνεται στην Εικόνα 42. Πιο συγκεκριμένα, τα δεδομένα μεταφέρθηκαν στο σύστημα Explain™ και ακολούθησε η επιλογή των αποτελεσμάτων, όπως ήδη έχει αναφερθεί (p -value < 0,05 , baseMean > 2). Η λίστα των μεταγράφων που προέκυψε, επιμερίστηκε στα μεταγραφα που υπερεκφάζονται, υποεκφράζονται ή είναι αμετάβλητα, στον υπό μελέτη πληθυσμό, σε σχέση με τον πληθυσμό-μάρτυρα. Το σύστημα στη συνέχεια ανέλυσε τους υποκινητές αυτών των γονιδίων για την παρουσία και τον αριθμό νουκλεοτιδικών μοτίβων που αντιστοιχούν σε θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης μεταφέρθηκαν σε διαγράμματα τύπου Venny, από τα οποία εξήχθησαν τα νουκλεοτιδικά μοτίβα των μεταγραφικών παραγόντων που είναι μοναδικά για τους υπό μελέτη πληθυσμούς και που εμφανίζονται περισσότερες φορές στους υποκινητές των υπό μελέτη γονιδίων (Εικόνα 43).



Εικόνα 43: Απεικόνιση των σημαντικότερων μεταγραφικών παραγόντων που ανιχνεύθηκαν στους υπό μελέτη πληθυσμούς ηπατοκυττάρων.

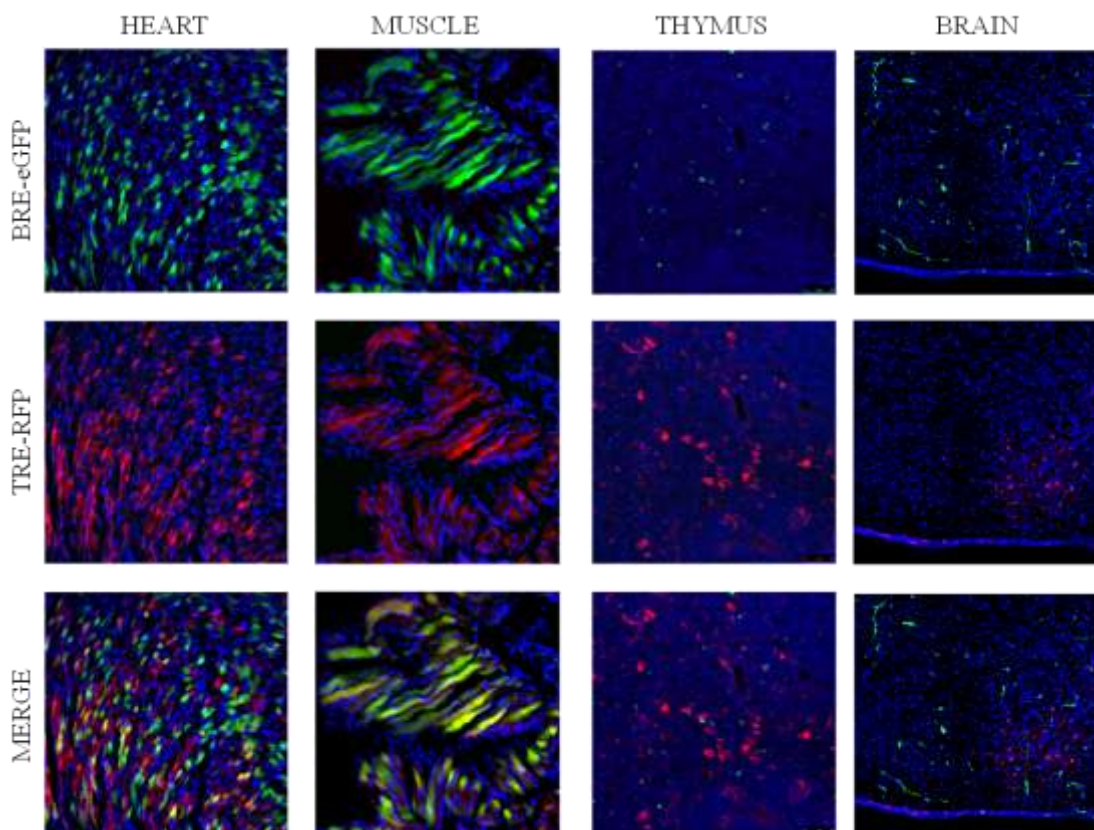
Όπως προέκυψε από αυτήν την ανάλυση, οι Smads, οι ενδοκυττάριοι δηλαδή μεσολαβητές της κανονικής TGF- β σηματοδότησης, είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες, γνωστά νουκλεοτιδικά μοτίβα πρόσδεσης των οποίων, εμφανίζονται πιο συχνά στους υποκινητές των γονιδίων που υπερεκφράζονται από τους κυτταρικούς πληθυσμούς που είναι θετικοί για τα διαγονίδια. Αντιθέτως, τα μοτίβα αυτά δεν εμφανίζονται στους υποκινητές των γονιδίων που υπερεκφράζονται από τους κυτταρικούς πληθυσμούς που είναι αρνητικοί για τα διαγονίδια.

Το εύρημα αυτό έρχεται να ενισχύσει την υπόθεση ότι οι κυτταρικοί πληθυσμοί που εκφράζουν τα διαγονίδια, βρίσκονται πράγματι κάτω από τη δράση της σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGF- β , και ως εκ' τούτου, οι διαγονιδιακοί μύες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, ανταποκρίνονται όπως αναμενόταν στα παραπάνω σηματοδοτικά μονοπάτια.

5.14. Ιστολογική ανάλυση της έκφρασης των διαγονιδίων σε άλλα όργανα ενήλικων TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακών μυών

Ολοκληρώνοντας την πρώτη αποτύπωση της έκφρασης των διαγονιδίων στο διπλά διαγονιδιακό ενήλικα μυ, μια σειρά οργάνων του σώματος, όπως η καρδιά, ο μυϊκός ιστός, ο θύμος και ο εγκέφαλος αναλύθηκαν ιστολογικά. Αναλύοντας το μυϊκό ιστό και το μυοκάρδιο από τους TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακούς μύες (Εικόνα 45), διαπιστώθηκε έντονη έκφραση των eGFP και RFP διαγονιδίων, χωρίς να ακολουθείται κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης.

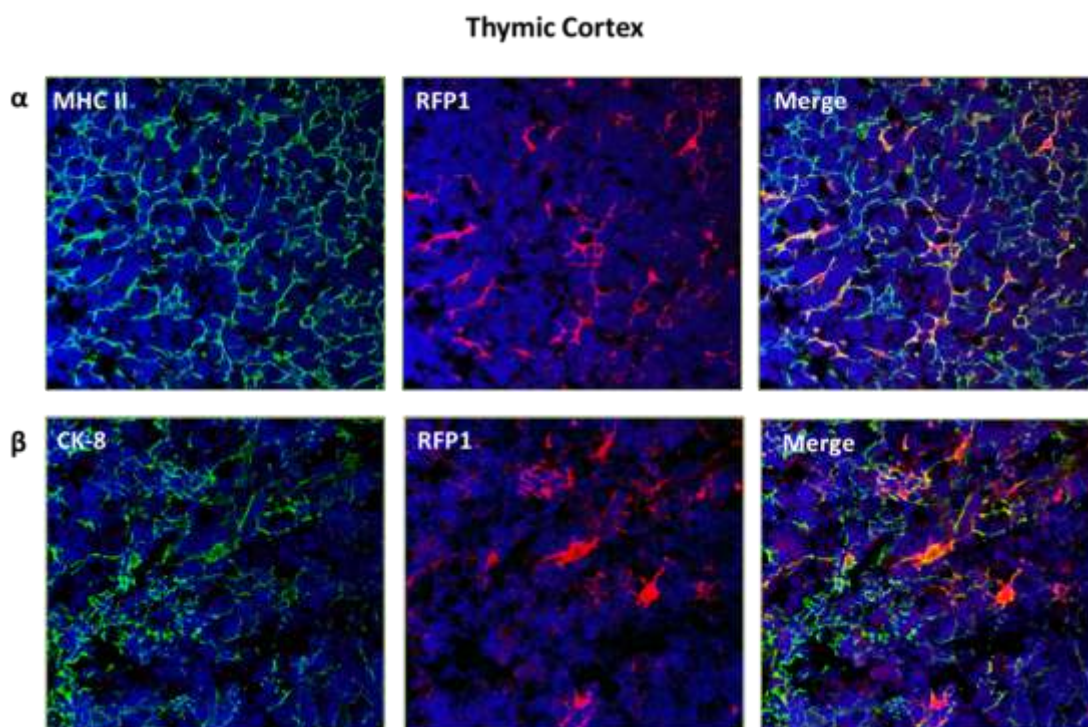
Από την ανάλυση του εγκεφάλου, ανιχνεύτηκε η έκφραση των διαγονιδίων σε διάφορες ανατομικές περιοχές του οργάνου, με εντονότερη έκφραση του RFP στις περιοχές γύρω από τις κοιλίες (Εικόνα 44) και έντονη έκφραση του eGFP, αλλά και του RFP, στους οσφρητικούς βολβούς (μη παρουσιαζόμενα αποτελέσματα).



Εικόνα 44: Ανίχνευση της κατανομής των διαγονιδίων στους TRE-RFP/BRE-eGFP διπλά διαγονιδιακούς μύες, με ανοσοφθορισμό. Ανάλυση του μυοκαρδίου, του μυϊκού ιστού, του θύμου και του εγκεφάλου.

Ο θύμος, ανατομικά και λειτουργικά, διακρίνεται στο φλοιό (cortex) και το μυελό (medulla). Από την ιστολογική ανάλυση αυτού του οργάνου με ανοσοφθορισμό, ανιχνεύεται ένα δίκτυο πεπλατυσμένων κυττάρων που είναι RFP και eGFP θετικά στο φλοιό του θύμου (Εικόνα 45), ενώ στο μυελό, τα RFP⁺ κύτταρα έχουν μεγάλο κυτταρόπλασμα και σφαιρικό σχήμα (Εικόνα 46).

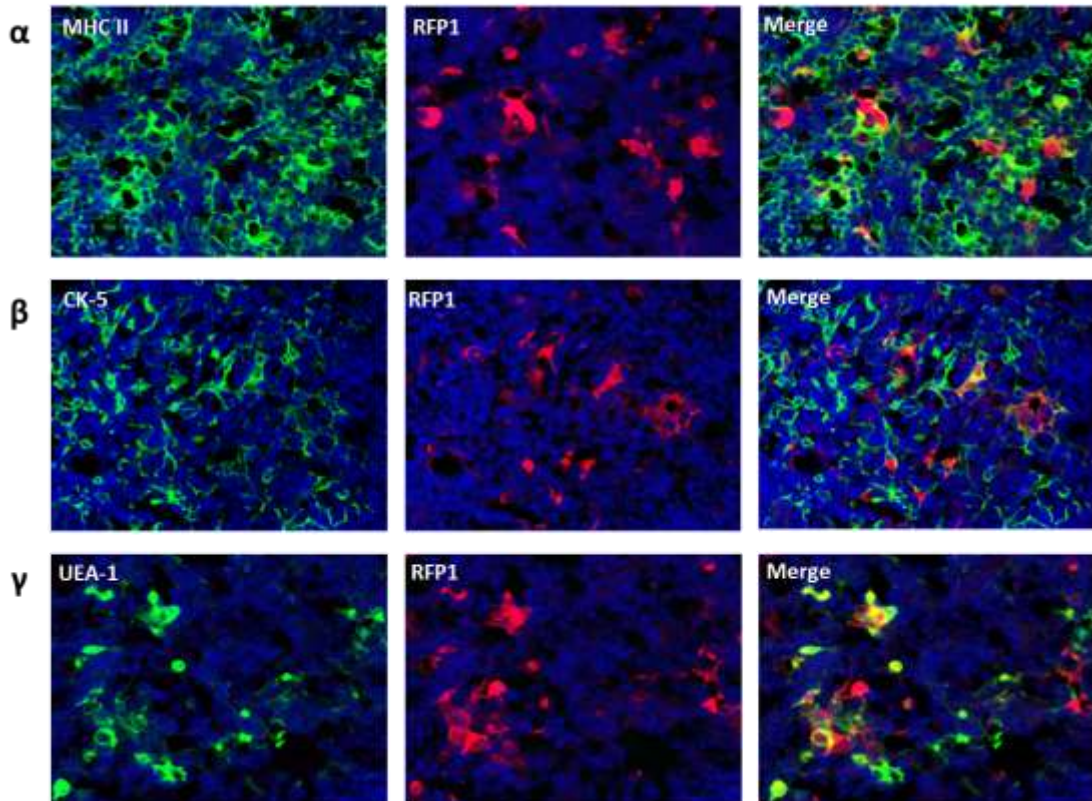
Ακολούθησε χρώση του θύμου, για το χαρακτηρισμό των RFP⁺ κυττάρων. Στο φλοιό, έγινε χρώση για τους δείκτες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHCII), όπως φαίνεται στην Εικόνα 44α και της κυτταροκερατίνης-8 (CK8), όπως φαίνεται στην Εικόνα 44β, που εκφράζονται από τα επιθηλιακά κύτταρα της συγκεκριμένης περιοχής. Και στις δύο περιπτώσεις, τα RFP⁺ κύτταρα, εκφράζουν και τους δύο επιθηλιακούς δείκτες, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι τα RFP⁺ κύτταρα της συγκεκριμένης περιοχής, είναι επιθηλιακά κύτταρα.



Εικόνα 45: Ανάλυση των RFP⁺ κυττάρων στο φλοιό του θύμου με βάση: α) Την έκφραση του MHCII, β) Την έκφραση του CK8.

Στο μυελό, έγινε χρώση για τους δείκτες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHCII) (Εικόνα 46α), της κυτταροκερατίνης-5 (CK5) (Εικόνα 46β) και της λεκτίνης *Ulex Europhaeus Agglutinin 1* (UEA1) (Εικόνα 46γ), που εκφράζονται από τα επιθηλιακά κύτταρα της συγκεκριμένης περιοχής. Σε όλες τις περιπτώσεις, σημαντικό ποσοστό των RFP⁺ κυττάρων, εκφράζουν τους τρεις αυτούς επιθηλιακούς δείκτες.

Thymic Medulla



Εικόνα 46: Ανάλυση των RFP⁺ κυττάρων στο μυελό του θύμου, με βάση: α) Την έκφραση του MHCII, β) Την έκφραση του CK8, γ) Την έκφραση του UEA-1.

Συμπερασματικά, από την ιστολογική ανάλυση του θύμου και την ανίχνευση των διαγονιδίων στα επιθηλιακά κύτταρα του οργάνου, συνάγεται το συμπέρασμα ότι τα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF-β πιθανών να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία αυτών των κυττάρων.

Κεφάλαιο 6

Σύνοψη Διατριβής

Είναι γνωστό ότι τα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF-β είναι πλειοτροπικές κυτταροκίνες, που συμμετέχουν σε μια σειρά σημαντικών, για τη ζωή, λειτουργιών, ενώ ο κεντρικός τους ρόλος κατά την ανάπτυξη αλλά και την παθοφυσιολογία, έχει ενδελεχώς μελετηθεί. Ωστόσο, οι κυτταρικοί στόχοι του μονοπατιού είναι εν πολλύς άγνωστοι, παρά το γεγονός ότι έχει πραγματοποιηθεί λεπτομερής χαρακτηρισμός των κυττάρων που παράγουν τα συγκεκριμένα μόρια.

Πρωταρχικός στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η δημιουργία διαγονιδιακών μυών αναφοράς που θα επέτρεπαν τον εντοπισμό των κυτταρικών στόχων του TGF-β σηματοδοτικού μονοπατιού. Για να επιτευχθεί αυτό, δημιουργήθηκε μια διαγονιδιακή κατασκευή που επέτρεψε την έκφραση της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης RFP, μετά από την ενεργοποίηση ενός συνθετικού υποκινητή, βασικό στοιχείο του οποίου ήταν το μοτίβο πρόσδεσης (80, 182) των Smad2-3-4, των ενδοκυττάρων δηλαδή διαβιβαστών της TGF-β/Activin-επαγόμενης, κανονικής σηματοδότησης. Η προσθήκη του SH4-insulator και στα δύο άκρα της διαγονιδιακής κατασκευής, βοήθησε στην αποτροπή φαινομένων αποσιώπησης της κατασκευής (222), όπως είχε παρατηρηθεί προηγουμένως σε αντίστοιχες προσπάθειες από άλλα εργαστήρια (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Ακολούθησε η δημιουργία οκτώ [8] διαγονιδιακών σειρών αναφοράς (TRE-RFP) που έφεραν τη διαγονιδιακή κατασκευή στο γένωμά τους. Μετά το χαρακτηρισμό αυτών των σειρών, επιλέγει η σειρά F6 ως η σειρά με το υψηλότερο επίπεδο έκφρασης του διαγονιδίου. Το πρότυπο έκφρασης στα βασικά όργανα των δύο σειρών με την υψηλότερη έκφραση του διαγονιδίου ήταν παρόμοιο, υποδεικνύοντας ότι η διαγονιδιακή έκφραση δεν επηρεάστηκε από το σημείο (ή τα σημεία) ένθεσης του διαγονιδίου. Από τα υπό ανάλυση όργανα, το πάγκρεας ήταν το όργανο με τα υψηλότερα επίπεδα διαγονιδιακής έκφρασης, ακολουθούμενο από το ήπαρ, την καρδιά, τον εγκέφαλο και τα άλλα όργανα. Με τη δημιουργία αυτών των διαγονιδιακών σειρών, κατέστη δυνατή η ανίχνευση των στόχων των TGF-β/Ακτιβινών σε κυτταρικό επίπεδο και όχι στο πιο αδρό επίπεδο του ιστού, όπως είχε

επιτευχθεί στο παρελθόν, με τη δημιουργία μιας αντίστοιχης διαγονιδιακής σειράς αναφοράς (183).

Για να επιβεβαιωθεί ότι όντως οι διαγονιδιακές σειρές που δημιουργήθηκαν ανταποκρίνονται στη σηματοδότηση μέσω TGF-β/Ακτιβινών, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης (άρα και ενεργοποιημένης) μορφής του ενδοκυττάρου διαβιβαστή της κανονικής σηματοδότησης, pSmad2, σε κύτταρα πνεύμονα διαγονιδιακού μυ που εκφράζουν το διαγονίδιο και σε κύτταρα του ίδιου οργάνου που δεν το εκφράζουν. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα κύτταρα που ήταν RFP θετικά, περιείχαν τουλάχιστον τέσσερις φορές υψηλότερα επίπεδα pSmad2, σε σχέση με τα κύτταρα που ήταν αρνητικά για το RFP.

Η υπεροικογένεια του TGF-β μπορεί να επιμεριστεί σε δύο βασικούς κλάδους, αυτόν που αναφέρεται στη σηματοδότηση από τους TGF-β/Ακτιβίνες και αυτόν που αναφέρεται στη σηματοδότηση από τους BMPs. Αν και έχουν καταγραφεί περιπτώσεις που οι δύο αυτοί κλάδοι μπορεί να ανταγωνίζονται ο ένας τον άλλο (223-225), κυρίως λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας του κοινού Co-Smad4, ο βαθμός διαπλοκής των δύο [2] αυτών κλάδων και η κατανομή των κυτταρικών τους στόχων κατά την ανάπτυξη, την ομοιόσταση και τη νόσο, δεν έχουν καταγραφεί.

Για να προσεγγιστεί αυτό το ερώτημα, έγινε διασταύρωση της διαγονιδιακής σειράς μυών αναφοράς TRE-RFP με τη διαγονιδιακή σειρά μυών αναφοράς BRE-eGFP, στην οποία οι κυτταρικοί στόχοι των BMPs εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη eGFP (184, 210). Αναλύοντας το χωροχρονικό πρότυπο έκφρασης των διαγονιδίων (RFP και eGFP), κατέστη δυνατή, για πρώτη φορά, η ταυτόχρονη καταγραφή και μελέτη της κατανομής των κυτταρικών στόχων των TGF-β/Ακτιβινών και των BMPs, προσφέροντας έτσι πολύτιμη πληροφορία για τον πιθανό ρόλο αυτών των μορίων στο σύνολό τους, αλλά και για την πολυπλοκότητα και τη σειρά των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα κατά τη σηματοδότηση από την υπεροικογένεια του TGF-β.

Βασικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης προσέγγισης αποτελεί το γεγονός ότι τα δύο [2] διαγονίδια ανταποκρίνονται στα ενδογενή επίπεδα των μορίων της υπερ-οικογένειας του TGF-β που παράγονται και δρουν κάθε φορά στο μικροπεριβάλλον του ιστού, οδηγώντας στο τελικό αποτέλεσμα, που είναι η ενεργοποίηση των επαγόμενων, από αυτά, γονιδίων-στόχων. Αυτό κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικό, μιας και σε πολλές περιπτώσεις είναι άγνωστα

τα επίπεδα των ενεργοποιητών σε κάθε δομική μονάδα του ιστού, οδηγώντας στην αυθαίρετη επέμβαση (εξωγενή προσθήκη ή αφαίρεση) στα επίπεδα αυτά, που καμία όμως σχέση δεν έχουν με την πραγματική κατάσταση του ιστού στην ομοιόσταση και στη νόσο.

Η αδρή καταγραφή της έκφρασης των διαγονιδίων σε διάφορους ιστούς, έρχεται να αποτυπώσει, σε όργανα όπως το ήπαρ, για πρώτη φορά, τους κυτταρικούς στόχους των TGF-β/Ακτιβινών και των BMPs, ενώ σε άλλα όργανα, όπως ο πνεύμονας (210) και τα νεφρά (226), έρχεται να συμπληρώσει την ήδη καταγεγραμμένη πληροφορία.

Η ανάλυση της έκφρασης των διαγονιδίων στα βασικά όργανα του πεπτικού συστήματος, αποτύπωσε την ενεργοποίηση της σηματοδότησης από την υπεροικογένεια του TGF-β, στην κρύπτη του λεπτού εντέρου, στην εξωκρινή και ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος, στα νεφρικά σωμάτια και σε ένα ποσοστό σωληναρίων του νεφρού, καθώς και στη ζώνη γύρω από τους κλάδους της κεντρικής αρτηρίας του ήπατος. Στις κρύπτες του εντέρου, οι BMPs δρουν ως αναστολείς του πολλαπλασιασμού των προγονικών κυττάρων που εντοπίζονται σε αυτήν την περιοχή (227, 228), ενώ έχει καταγραφεί η έκφραση του TGF-β1 σε αυτήν την περιοχή (229), ο οποίος αποτελεί έναν από τους πιο ισχυρούς παράγοντες αναστολής πολλαπλασιασμού του συνόλου των κυττάρων της κρύπτης (230). Η σημασία της Smad-μεσολαβούμενης σηματοδότησης στη λειτουργία του παγκρέατος είναι εμφανής και μόνο από το γεγονός ότι ο Smad4 ονομάζεται και DPC4 (Deleted in Pancreatic Cancer, locus 4), μιας και χαρακτηρίστηκε έτσι λόγω της συχνότητας εμφάνισης μεταλλαγών του γενετικού αυτού τύπου, σε καρκίνους του παγκρέατος (76, 231). Τα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF-β, εκφράζονται στην ενδοκρινή και εξωκρινή μοίρα του οργάνου (232) και ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων του παγκρέατος (232). Στο νεφρό και στο ήπαρ (όπως και στα περισσότερα όργανα), η υπερέκφραση του TGF-β οδηγεί σε ίνωση (233), ενώ οι BMPs, ειδικά ο BMP7, ανταγωνίζονται αυτήν τη δράση (234). Τα ευρήματα από την παρούσα μελέτη έρχονται να επιβεβαιώσουν τις προηγούμενες αναφορές, όσον αφορά τις ανατομικές περιοχές στις οποίες η δράση των μορίων της TGF-β υπερ-οικογένειας φαίνεται να είναι καθοριστική για την ομοιόσταση, επιτρέποντας ταυτόχρονα την απομόνωση και τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των κυττάρων-στόχων.

Στο θύμο, ο TGF-β δρώντας πάνω στα επιθηλιακά κύτταρα, οδηγεί σταδιακά στον εκφυλισμό του οργάνου και στην αναστολή της ωρίμανσης των κυττάρων του θύμου με την

πάροδο της ηλικίας (235). Ίδιος φαινότυπος εμφανίζεται μετά από επιλεκτική υπερέκφραση του αναστολέα των BMPs, Noggin, στα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου (236). Καθώς στην παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκε η έκφραση των διαγονιδίων στα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου, ο περαιτέρω χαρακτηρισμός των κυτταρικών πληθυσμών που ανταποκρίνονται στη σηματοδότηση από την υπερ-οικογένεια του TGF- β , θα επιτρέψει τη διερεύνηση των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών που ευθύνονται για αυτό το φαινόμενο.

Τα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF- β είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική ανάπτυξη του πνεύμονα και εμπλέκονται σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων, όπως περιγράφεται και στην παράγραφο 1.6. Καταγράφοντας την έκφραση των δυο διαγονιδίων κατά την ανάπτυξη του πνεύμονα, διαπιστώθηκε η βαθμιαία μείωση της παρουσίας των κυττάρων που δέχονται σηματοδότηση από τους BMPs κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του οργάνου, ενώ το επίπεδο της σηματοδότησης από τους TGF- β /Ακτιβίνες διατηρείται και στον ενήλικα πνεύμονα. Η έκφραση και των δυο διαγονιδίων κορυφώθηκε κατά τη γέννα, αποτυπώνοντας τον κομβικό ρόλο της σηματοδότησης από τα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF- β στη φάση αυτή, κατά την οποία το όργανο αρχίζει να λειτουργεί και λαμβάνει χώρα ένας καταρράκτης βίαιων μοριακών και κυτταρικών διεργασιών, προκειμένου να εξυπηρετηθεί η αναπνοή (237). Αναλύοντας τον ενήλικα πνεύμονα, χαρακτηρίστηκαν, για πρώτη φορά, ως οι κύριοι κυτταρικοί στόχοι των TGF- β /Ακτιβινών, τα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Αυτό το εύρημα έρχεται να συμπληρώσει την πληροφορία που υπάρχει σχετικά με τη δράση του TGF- β σε αυτόν τον κυτταρικό πληθυσμό (92, 238, 239). Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα, ήταν ο εντοπισμός κυττάρων του βρογχικού επιθηλίου που εξέφραζαν τα διαγονίδια στα νευροεπιθηλιακά σωματίδια, τα οποία ως γνωστόν αποτελούν την κύρια πηγή των στελεχιαίων κυττάρων του βρογχικού επιθηλίου (240). Η ανάλυση των κυττάρων που βρίσκονται υπό τη δράση των BMPs επιβεβαίωσε την υπόθεση ότι αυτά τα κύτταρα είναι εμπλουτισμένα σε προγονικά στελεχιαία κύτταρα (210), ενώ εκκρεμεί η ανάλυση των κυττάρων που βρίσκονται υπό τη δράση των TGF- β /Ακτιβινών ή και των δύο κλάδων της υπερ-οικογένειας του TGF- β .

Με τη χρήση τριών διαφορετικών μοντέλων πνευμονικής βλάβης, διερευνήθηκε η συμμετοχή των υπό μελέτη σηματοδοτικών μονοπατιών στην εξέλιξη της νόσου. Το μοντέλο της μπλεομυκίνης είναι ίσως το πιο κοινό για τη μελέτη της πνευμονικής ίνωσης, στην οποία ο ρόλος του TGF- β είναι κεντρικός (107, 109, 110, 204). Παρά όμως τις εκτενείς μελέτες και

την εμπλοκή του TGF-β στη συσσώρευση και τη δράση των ινοβλαστών (48, 116-118, 213-216, 239), του κυρίαρχου παθολογικού πληθυσμού στην ίνωση, οι άμεσοι κυτταρικοί στόχοι του TGF-β δεν έχουν αποκαλυφθεί. Από την παρούσα μελέτη φαίνεται ότι υπάρχει επανενεργοποίηση και των δυο κλάδων της σηματοδότησης του TGF-β στις περιοχές της ιστικής βλάβης, αλλά τα κύτταρα που εκφράζουν τα διαγονίδια, ιδιαίτερα αυτά που εκφράζουν το RFP, δεν εκφράζουν δείκτες ινοβλαστών. Η χρήση του μοντέλου πνευμονικής βλάβης με τη χορήγηση ναφθαλενίου, ανέδειξε την ενεργοποίηση της σηματοδότησης από τους TGF-β/Ακτιβίνες και BMPs στα κύτταρα που εντοπίζονται στα νευροεπιθηλιακά σωματίδια, υποδεικνύοντας τον πιθανό ρόλο των σηματοδοτικών αυτών μονοπατιών στην αναγέννηση του βρογχικού επιθηλίου. Τέλος, η χρήση του μοντέλου αλλεργικής φλεγμονής των αεραγωγών μετά από χορήγηση οβαλβουμίνης, οδήγησε στην ανίχνευση φλεγμονωδών κυττάρων που βρίσκονται υπό τη δράση της σηματοδότησης από τους TGF-β/Ακτιβίνες, στα φλεγμονώδη διηθήματα. Σε όλες τις περιπτώσεις πειραματικής πρόκλησης πνευμονικής βλάβης, επιβεβαιώθηκε η ενεργοποίηση των διαγονιδίων στις περιοχές της βλάβης, ενώ ο απώτερος στόχος είναι η απομόνωση των κυτταρικών πληθυσμών που δέχονται σηματοδότηση από τους BMPs και TGF-β/Ακτιβίνες και ο λεπτομερής κυτταρικός, μοριακός και λειτουργικός χαρακτηρισμός τους.

Η δράση των μορίων της υπερ-οικογένειας του TGF-β κατά την ανάπτυξη και την παθοφυσιολογία του ήπατος αναπτύχθηκε ήδη στην παράγραφο 1.7. Παρόλα αυτά, το χρονοχρονικό πρότυπο δράσης αυτών των μορίων, από την πρώιμη ανάπτυξη μέχρι και την ωρίμανση του οργάνου, παρέμεναν άγνωστα. Από την παρούσα μελέτη φαίνεται ότι υπάρχει μια σταδιακή ενεργοποίηση των δύο [2] διαγονιδίων, με την υψηλότερη έκφραση τρεις [3] ημέρες μετά τη γέννα, συνοδευόμενη από αντίστοιχο πρότυπο έκφρασης των pSmad2 και pSmad1-5-8, υποδηλώνοντας την αντίστοιχη ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω των TGF-β/Ακτιβινών και των BMPs, κατά τη φάση που το όργανο αρχίζει να είναι μεταβολικά ενεργό. Στα τελικά στάδια της ωρίμανσης του οργάνου, η έκφραση και των δυο διαγονιδίων περιορίζεται κυρίως στη ζώνη των ηπατοκυττάρων γύρω από τους κλάδους της κεντρικής φλέβας, υποδεικνύοντας την ύπαρξη ενός είδους ζωνοποίησης (Liver zonation) στη δράση των μορίων της υπερ-οικογένειας του TGF-β, αντίστοιχης με αυτήν που έχει περιγραφεί για τη δράση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt (241). Το φαινόμενο της ύπαρξης διαφορετικών μεταβολικών ζωνών στον ηπατικό ιστό είναι μοναδικό και η

συσχέτιση, για πρώτη φορά, του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β με αυτό το φαινόμενο μπορεί να βοηθήσει στη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν αυτό το φαινόμενο. Η έκφραση του eGFP στους ηπατοβλάστες κατά την πρώιμη φάση της ανάπτυξης του ήπατος, συνηγορεί με το σημαντικό ρόλο των BMPs στην πρώιμη ηπατική ανάπτυξη (137, 144). Παράλληλα, η έκφραση του RFP, που εντοπίζεται κυρίως στα πρώιμα και ώριμα χολλαγγειοκύτταρα, επεκτείνει την προτέρα γνώση σχετικά με το ρόλο του TGF-β στην ανάπτυξη του δικτύου των χοληφόρων αγγείων (140), υποδεικνύοντάς τον ως μόριο που μεσολαβεί στην ωρίμανση των επιθηλιακών κυττάρων της περιοχής αυτής. Η ανίχνευση δε, της έκφρασης eGFP σε κύτταρα με χαρακτηριστικά στελεχειαίων κυττάρων στον ενήλικα ιστό, μπορεί, για πρώτη φορά, να επιτρέψει τη μελέτη του ρόλου των BMPs στην αναγέννηση του ηπατικού ιστού κατά την ομοιόσταση.

Για να διερευνηθεί ο ρόλος των μορίων της υπερ-οικογένειας του TGF-β στην παθοφυσιολογία του ήπατος, χρησιμοποιήθηκαν τρία [3] μοντέλα βλάβης, όπως περιγράφονται στην Παράγραφο 5.11. Η χειρουργική αφαίρεση των 2/3 του ήπατος, οδήγησε στην ενεργοποίηση των δυο [2] διαγονιδίων, δυο [2] και επτά [7] ημέρες μετά την επέμβαση. Είναι γνωστό ότι κατά την αναγέννηση του οργάνου, ο TGF-β υπερεκφράζεται, ακολουθώντας ένα κύμα αναγέννησης από την περιοχή γύρω από την πυλαία φλέβα προς την περιοχή γύρω από την κεντρική φλέβα. Και στα δυο [2] στάδια που μελετήθηκαν, τα επίπεδα έκφρασης του TGF-β είναι υψηλά γύρω από την κεντρική φλέβα (141), δικαιολογώντας έτσι την υπερέκφραση του RFP σε αυτήν την περιοχή και υπογραμμίζοντας το σημαντικό ρόλο του TGF-β και της Ακτιβίνης στην αναγεννητική διαδικασία, ύστερα από ιστική βλάβη (170). Στο μοντέλο της νηστείας από την άλλη, το κύριο χαρακτηριστικό είναι η κυτταρική απόπτωση, κατά την οποία ο ρόλος του TGF-β έχει ενδελεχώς μελετηθεί (145, 146). Και στα δύο μοντέλα που προαναφέρθηκαν, περιγράφεται, για πρώτη φορά, η ταυτόχρονη κατανομή των κυτταρικών στόχων των TGF-β/Ακτιβινών αλλά και των BMPs, αποκαλύπτοντας τη στενή αλληλοσυσχέτιση, αλλά και τις ομοιότητες στο πρότυπο δράσης αυτών των μορίων. Στο μοντέλο της ηπατικής βλάβης μετά από χορήγηση Κονκαναβαλίνης Α, η υπερέκφραση του RFP συνάδει με το ρόλο του TGF-β στην απόπτωση των ηπατοκυττάρων μέσω του Smad3, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενη μελέτη (242).

Συμπερασματικά, από τη χρήση των ζωικών μοντέλων βλάβης του ήπατος και του πνεύμονα, επιβεβαιώθηκαν εν πολλύς προηγούμενα ευρήματα από άλλες μελέτες, αλλά

επιπρόσθετα, αποκαλύφθηκε, για πρώτη φορά, το σχετικό πρότυπο κατανομής των κυτταρικών στόχων των TGF-β/Ακτιβινών και των BMPs, υποδεικνύοντας τα σημεία δράσης και ενεργοποίησης αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών. Η δράση του συνόλου των μορίων της υπερ-οικογένειας του TGF-β φαίνεται να είναι σημαντική για το τελικό αποτέλεσμα, επιβεβαιώνοντας έτσι τη στρατηγική επιλογή της ταυτόχρονης μελέτης και των δυο κλάδων της TGF-β σηματοδότησης. Η δυνατότητα απομόνωσης των κυτταρικών στόχων των δύο αυτών κλάδων σηματοδότησης θα επιτρέψει τη διερεύνηση των σχετικών επιπέδων ενεργοποίησης των γονιδίων-στόχων από τους TGF-β/Ακτιβίνες και τους BMPs, που οδηγεί σε ένα καθορισμένο κυτταρικό αποτέλεσμα.

Βασιζόμενοι στην ιδέα της ρύθμισης της κυτταρικής λειτουργίας από το σχετικό ισοζύγιο ενεργοποίησης από τους TGF-β/Ακτιβίνες και τους BMPs, επελέγη η προσέγγιση της απομόνωσης των κυτταρικών πληθυσμών των ηπατοκυττάρων που δέχονται σηματοδότηση από τους υπό μελέτη κλάδους της υπερ-οικογένειας του TGF-β. Η επιλογή των ηπατοκυττάρων ως ο ιδανικός κυτταρικός τύπος για τη συγκεκριμένη μελέτη, οφείλεται στο γεγονός ότι τα ηπατοκύτταρα αποτελούν τον κυρίαρχο πληθυσμό στο ήπαρ και μπορούν να απομονωθούν με απλές διαδικασίες, επιτρέποντας τη λήψη του κυτταρικού αριθμού που απαιτείται για την περαιτέρω ανάλυσή τους. Επιπλέον, το σαφές πρότυπο έκφρασης των διαγονιδίων στο ήπαρ γύρω από τους κλάδους της κεντρικής φλέβας, υποδηλώνει τη συμμετοχή των μορίων της υπερ-οικογένειας του TGF-β στη λειτουργική ζωνοποίηση του ήπατος.

Η πιο σύγχρονη και λεπτομερής μέθοδος για το χαρακτηρισμό των υπό μελέτη πληθυσμών, είναι η ανάλυση του μεταγραφώματος (transcriptome) με τη μέθοδο της επόμενης γενεάς αλληλούχισης (Next Generation Sequencing), ή αλλιώς RNA-Seq. Για να επιτευχθεί αυτό, συνελέγησαν τα απαιτούμενα δείγματα, από τα οποία δημιουργήθηκαν cDNA βιβλιοθήκες και ακολούθησε η αλληλουχισή τους με τη χρήση κατάλληλου εξοπλισμού. Η ποιότητα της διαδικασίας επιβεβαιώθηκε με τον προσδιορισμό των RFP και eGFP μεταγράφων, στις υπό ανάλυση βιβλιοθήκες. Ακολούθησε σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά από προηγούμενη μελέτη (221), για να επιβεβαιωθεί η ορθότητα του διαχωρισμού των ηπατοκυττάρων, σε αυτά που εντοπίζονται γύρω από τους κλάδους της πυλαίας φλέβας και σε αυτά που εντοπίζονται γύρω από τους κλάδους της κεντρικής φλέβας. Επιπλέον, το βάθος της ανάλυσης με τη μέθοδο RNA-Seq επέτρεψε την καταγραφή αρκετών γονιδίων,

των οποίων η έκφραση, για πρώτη φορά, εντοπίζεται κυρίως πέριξ της πυλαίας ή της κεντρικής φλέβας του ήπατος, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα να καταγραφούν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια τα μόρια που συμμετέχουν σε συγκεκριμένες μεταβολικές διεργασίες κατά τη λειτουργία του οργάνου.

Για να διερευνηθεί η εμπλοκή των μελών της υπερ-οικογένειας του TGF- β στην ενεργοποίηση των διαγονιδίων, αναλύθηκαν οι υποκινητές των γονιδίων που υπερεκφράζονται στα ηπατοκύτταρα που είναι θετικά για τα διαγονίδια RFP και eGFP, για την παρουσία αλληλουχιών πρόσδεσης των ενδοκυττάρων διαβιβαστών της σηματοδότησης Smads, με τη χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής ανάλυσης. Από αυτήν την ανάλυση, προέκυψε ότι πράγματι οι υποκινητές αυτών των γονιδίων είναι εμπλουτισμένοι σε περιοχές πρόσδεσης των Smads, ενισχύοντας έτσι την πεποίθηση ότι τα διαγονίδια ανταποκρίνονται στη σηματοδότηση από τα μέλη της υπερ-οικογένειας του TGF- β . Θα ακολουθήσει λεπτομερής ανάλυση των μεταβολικών, και των εν γένει κυτταρικών διεργασιών που ενεργοποιούνται στους υπό μελέτη κυτταρικούς πληθυσμούς, ούτως ώστε να καταστεί δυνατή η καταγραφή των επιδράσεων των δύο κλάδων της TGF- β σηματοδότησης, στο ήπαρ.

Συμπερασματικά, η δημιουργία ενός εργαλείου που επιτρέπει την παράλληλη μελέτη των κυτταρικών στόχων των TGF- β /Ακτιβινών από τη μία, και των BMPs από την άλλη, θα βοηθήσει στην κατανόηση της σημασίας που έχει η σχετική ισορροπία των μελών της υπερ-οικογένειας του TGF- β , για την ομοιόσταση και την εξέλιξη της παθολογίας, ενώ παράλληλα θα επιτρέψει το σχεδιασμό στοχευμένων προσεγγίσεων για την κατανόηση της δράσης των υπό μελέτη μορίων, αλλά και για τη διαχείρισή τους, προς όφελος αποτελεσματικότερων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Βιβλιογραφία

- [1] **Lawrence, D.A.**, "Transforming growth factor-beta: a general review", *Eur Cytokine Netw*, 1996: 7(3): p. 363-74.
- [2] **Sporn, M.B., et al.**, "Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure", *Science*, 1986: 233(4763): p. 532-4.
- [3] **Moustakas, A., et al.**, "Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation", *Immunol Lett*, 2002: 82(1-2): p. 85-91.
- [4] **Kitisin, K., et al.**, "Tgf-Beta signaling in development", *Sci STKE*, 2007: 2007(399): p. cml.
- [5] **Wu, M.Y. and C.S. Hill**, "Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis", *Dev Cell*, 2009: 16(3): p. 329-43.
- [6] **Savage, C., et al.**, "Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996: 93(2): p. 790-4.
- [7] **Raftery, L.A. and D.J. Sutherland**, "TGF-beta family signal transduction in Drosophila development: from Mad to Smads", *Dev Biol*, 1999: 210(2): p. 251-68.
- [8] **Schmierer, B. and C.S. Hill**, "TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007: 8(12): p. 970-82.
- [9] **Itoh, S., et al.**, "Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins", *Eur J Biochem*, 2000: 267(24): p. 6954-67.
- [10] **Treichel, J.A., M. Reddington, and G.W. Kreutzberg**, "Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 mRNA accumulation by basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta1 in cultured rat astrocytes", *J Neurochem*, 1998: 71(5): p. 1944-52.
- [11] **Park, S.H.**, "Fine tuning and cross-talking of TGF-beta signal by inhibitory Smads", *J Biochem Mol Biol*, 2005: 38(1): p. 9-16.
- [12] **Martin, J.S., et al.**, "Analysis of homozygous TGF beta 1 null mouse embryos demonstrates defects in yolk sac vasculogenesis and hematopoiesis", *Ann NY Acad Sci*, 1995: 752: p. 300-8.
- [13] **Kulkarni, A.B. and S. Karlsson**, "Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease", *Am J Pathol*, 1993: 143(1): p. 3-9.
- [14] **Oshima, M., H. Oshima, and M.M. Taketo**, "TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis", *Dev Biol*, 1996: 179(1): p. 297-302.
- [15] **Larsson, J., et al.**, "Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice", *Embo J*, 2001: 20(7): p. 1663-73.
- [16] **Sanford, L.P., et al.**, "TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes", *Development*, 1997: 124(13): p. 2659-70.

- [17] **Proetzel, G., et al.**, "Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion", *Nat Genet*, 1995: 11(4): p. 409-14.
- [18] **Taya, Y., S. O'Kane, and M.W. Ferguson**, "Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice", *Development*, 1999: 126(17): p. 3869-79.
- [19] **Zhang, H. and A. Bradley**, "Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development", *Development*, 1996: 122(10): p. 2977-86.
- [20] **Daluiski, A., et al.**, "Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density", *Nat Genet*, 2001: 27(1): p. 84-8.
- [21] **Winnier, G., et al.**, "Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse", *Genes Dev*, 1995: 9(17): p. 2105-16.
- [22] **King, J.A., et al.**, "BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice", *Dev Biol*, 1994: 166(1): p. 112-22.
- [23] **Kingsley, D.M., et al.**, "The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily", *Cell*, 1992: 71(3): p. 399-410.
- [24] **Solloway, M.J., et al.**, "Mice lacking Bmp6 function", *Dev Genet*, 1998: 22(4): p. 321-39.
- [25] **Jena, N., et al.**, "BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye", *Exp Cell Res*, 1997: 230(1): p. 28-37.
- [26] **Mishina, Y., et al.**, "Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis", *Genes Dev*, 1995: 9(24): p. 3027-37.
- [27] **Matzuk, M.M., et al.**, "Functional analysis of activins during mammalian development", *Nature*, 1995: 374(6520): p. 354-6.
- [28] **Gu, Z., et al.**, "The type I activin receptor ActRIB is required for egg cylinder organization and gastrulation in the mouse", *Genes Dev*, 1998: 12(6): p. 844-57.
- [29] **Bonnaud, P., et al.**, "TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis", *J Immunol*, 2005: 175(8): p. 5390-5.
- [30] **Wahl, S.M.**, "Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure", *J Clin Immunol*, 1992: 12(2): p. 61-74.
- [31] **Wahl, S.M., N. McCartney-Francis, and S.E. Mergenhagen**, "Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF-beta", *Immunol Today*, 1989: 10(8): p. 258-61.
- [32] **Yoshimura, A., Y. Wakabayashi, and T. Mori**, "Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta", *J Biochem*: 147(6): p. 781-92.
- [33] **Fu, S., et al.**, "TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors", *Am J Transplant*, 2004: 4(10): p. 1614-27.
- [34] **Wan, Y.Y. and R.A. Flavell**, "TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity", *J Clin Immunol*, 2008: 28(6): p. 647-59.
- [35] **Roberts, A.B. and M.B. Sporn**, "Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta)", *Growth Factors*, 1993: 8(1): p. 1-9.

- [36] **Hocevar, B.A. and P.H. Howe**, "Mechanisms of TGF-beta-induced cell cycle arrest", *Miner Electrolyte Metab*, 1998: 24(2-3): p. 131-5.
- [37] **Akhurst, R.J. and R. Derynck**, "TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword", *Trends Cell Biol*, 2001: 11(11): p. S44-51.
- [38] **Derynck, R., R.J. Akhurst, and A. Balmain**, "TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression", *Nat Genet*, 2001: 29(2): p. 117-29.
- [39] **Massague, J.**, "TGFbeta in Cancer", *Cell*, 2008: 134(2): p. 215-30.
- [40] **Bierie, B. and H.L. Moses**, "TGF-beta and cancer", *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006: 17(1-2): p. 29-40.
- [41] **Roberts, A.B., B.K. McCune, and M.B. Sporn**, "TGF-beta: regulation of extracellular matrix", *Kidney Int*, 1992: 41(3): p. 557-9.
- [42] **Leask, A. and D.J. Abraham**, "TGF-beta signaling and the fibrotic response", *Faseb J*, 2004: 18(7): p. 816-27.
- [43] **Hocevar, B.A., T.L. Brown, and P.H. Howe**, "TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway", *Embo J*, 1999: 18(5): p. 1345-56.
- [44] **Dempsey, L.A.**, "Regulation by proteoglycans", *Nat Immunol*: 13(1): p. 19.
- [45] **Burch, M.L., W. Zheng, and P.J. Little**, "Smad linker region phosphorylation in the regulation of extracellular matrix synthesis", *Cell Mol Life Sci*: 68(1): p. 97-107.
- [46] **Mauviel, A.**, "Transforming growth factor-beta: a key mediator of fibrosis", *Methods Mol Med*, 2005: 117: p. 69-80.
- [47] **Schiller, M., D. Javelaud, and A. Mauviel**, "TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing", *J Dermatol Sci*, 2004: 35(2): p. 83-92.
- [48] **Roberts, A.B., et al.**, "Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis", *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006: 17(1-2): p. 19-27.
- [49] **Ihn, H.**, "Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF", *Curr Opin Rheumatol*, 2002: 14(6): p. 681-5.
- [50] **Apostolou, E., et al.**, "Activin-A overexpression in the murine lung causes pathology that simulates acute respiratory distress syndrome", *Am J Respir Crit Care Med*: 185(4): p. 382-91.
- [51] **Moustakas, A. and C.H. Heldin**, "The regulation of TGFbeta signal transduction", *Development*, 2009: 136(22): p. 3699-714.
- [52] **Assoian, R.K., et al.**, "Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization", *J Biol Chem*, 1983: 258(11): p. 7155-60.
- [53] **ten Dijke, P. and H.M. Arthur**, "Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007: 8(11): p. 857-69.
- [54] **Ono, R.N., et al.**, "Latent transforming growth factor beta-binding proteins and fibulins compete for fibrillin-1 and exhibit exquisite specificities in binding sites", *J Biol Chem*, 2009: 284(25): p. 16872-81.

- [55] **Rifkin, D.B.**, "Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability", *J Biol Chem*, 2005: 280(9): p. 7409-12.
- [56] **Isogai, Z., et al.**, "Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein", *J Biol Chem*, 2003: 278(4): p. 2750-7.
- [57] **Ge, G., et al.**, "GDF11 forms a bone morphogenetic protein 1-activated latent complex that can modulate nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells", *Mol Cell Biol*, 2005: 25(14): p. 5846-58.
- [58] **Wolfman, N.M., et al.**, "Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003: 100(26): p. 15842-6.
- [59] **Degnin, C., et al.**, "Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4", *Mol Biol Cell*, 2004: 15(11): p. 5012-20.
- [60] **Dick, A., et al.**, "Essential role of Bmp7 (snailhouse) and its prodomain in dorsoventral patterning of the zebrafish embryo", *Development*, 2000: 127(2): p. 343-54.
- [61] **Le Good, J.A., et al.**, "Nodal stability determines signaling range", *Curr Biol*, 2005: 15(1): p. 31-6.
- [62] **Shi, Y. and J. Massague**, "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus", *Cell*, 2003: 113(6): p. 685-700.
- [63] **Wrana, J.L., et al.**, "Mechanism of activation of the TGF-beta receptor", *Nature*, 1994: 370(6488): p. 341-7.
- [64] **Goumans, M.J., et al.**, "Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling", *Mol Cell*, 2003: 12(4): p. 817-28.
- [65] **Oh, S.P., et al.**, "Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000: 97(6): p. 2626-31.
- [66] **Ward, S.M., et al.**, "Transforming growth factor beta (TGFbeta) signaling via differential activation of activin receptor-like kinases 2 and 5 during cardiac development. Role in regulating parasympathetic responsiveness", *J Biol Chem*, 2002: 277(51): p. 50183-9.
- [67] **Di Guglielmo, G.M., et al.**, "Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover", *Nat Cell Biol*, 2003: 5(5): p. 410-21.
- [68] **Le Roy, C. and J.L. Wrana**, "Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005: 6(2): p. 112-26.
- [69] **Esparza-Lopez, J., et al.**, "Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A", *J Biol Chem*, 2001: 276(18): p. 14588-96.
- [70] **Gatza, C.E., S.Y. Oh, and G.C. Blobe**, "Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer", *Cell Signal*: 22(8): p. 1163-74.

- [71] **Santibanez, J.F., et al.**, "Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling", *J Cell Physiol*, 2007: 210(2): p. 456-68.
- [72] **Groppe, J., et al.**, "Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding", *Mol Cell*, 2008: 29(2): p. 157-68.
- [73] **Massague, J. and D. Wotton**, "Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system", *Embo J*, 2000: 19(8): p. 1745-54.
- [74] **Zhang, Y.E.**, "Non-Smad pathways in TGF-beta signaling", *Cell Res*, 2009: 19(1): p. 128-39.
- [75] **Sekelsky, J.J., et al.**, "Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*", *Genetics*, 1995: 139(3): p. 1347-58.
- [76] **Hahn, S.A., et al.**, "DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1", *Science*, 1996: 271(5247): p. 350-3.
- [77] **Hill, C.S.**, "Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins", *Cell Res*, 2009: 19(1): p. 36-46.
- [78] **Feng, X.H. and R. Derynck**, "A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity", *Embo J*, 1997: 16(13): p. 3912-23.
- [79] **Massague, J.**, "How cells read TGF-beta signals", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000: 1(3): p. 169-78.
- [80] **Shi, Y., et al.**, "Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling", *Cell*, 1998: 94(5): p. 585-94.
- [81] **Matsuura, I., et al.**, "Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads", *Nature*, 2004: 430(6996): p. 226-31.
- [82] **Wicks, S.J., et al.**, "Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II", *Mol Cell Biol*, 2000: 20(21): p. 8103-11.
- [83] **Qin, B.Y., et al.**, "Smad3 allostery links TGF-beta receptor kinase activation to transcriptional control", *Genes Dev*, 2002: 16(15): p. 1950-63.
- [84] **Nagarajan, R.P. and Y. Chen**, "Structural basis for the functional difference between Smad2 and Smad3 in FAST-2 (forkhead activin signal transducer-2)-mediated transcription", *Biochem J*, 2000: 350 Pt 1: p. 253-9.
- [85] **Wotton, D., et al.**, "A Smad transcriptional corepressor", *Cell*, 1999: 97(1): p. 29-39.
- [86] **Luo, K., et al.**, "The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling", *Genes Dev*, 1999: 13(17): p. 2196-206.
- [87] **Heine, U.I., et al.**, "Colocalization of TGF-beta 1 and collagen I and III, fibronectin and glycosaminoglycans during lung branching morphogenesis", *Development*, 1990: 109(1): p. 29-36.
- [88] **Schmid, P., et al.**, "Differential expression of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 genes during mouse embryogenesis", *Development*, 1991: 111(1): p. 117-30.

- [89] **Masui, T., et al.**, "Type beta transforming growth factor is the primary differentiation-inducing serum factor for normal human bronchial epithelial cells", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986: 83(8): p. 2438-42.
- [90] **Ten Have-Opbroek, A.A.**, "Lung development in the mouse embryo", *Exp Lung Res*, 1991: 17(2): p. 111-30.
- [91] **Xing, Y., et al.**, "Signaling via Alk5 controls the ontogeny of lung Clara cells", *Development*: 137(5): p. 825-33.
- [92] **Chen, H., et al.**, "TGF-beta receptor II in epithelia versus mesenchyme plays distinct roles in the developing lung", *Eur Respir J*, 2008: 32(2): p. 285-95.
- [93] **Kaartinen, V., et al.**, "Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction", *Nat Genet*, 1995: 11(4): p. 415-21.
- [94] **Bellusci, S., et al.**, "Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis", *Development*, 1997: 124(1): p. 53-63.
- [95] **Weaver, M., N.R. Dunn, and B.L. Hogan**, "Bmp4 and Fgf10 play opposing roles during lung bud morphogenesis", *Development*, 2000: 127(12): p. 2695-704.
- [96] **Shannon, J.M. and B.A. Hyatt**, "Epithelial-mesenchymal interactions in the developing lung", *Annu Rev Physiol*, 2004: 66: p. 625-45.
- [97] **Kim, N. and T.H. Vu**, "Parabronchial smooth muscle cells and alveolar myofibroblasts in lung development", *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2006: 78(1): p. 80-9.
- [98] **Lyons, K.M., B.L. Hogan, and E.J. Robertson**, "Colocalization of BMP 7 and BMP 2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development", *Mech Dev*, 1995: 50(1): p. 71-83.
- [99] **Bellusci, S., et al.**, "Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung", *Development*, 1997: 124(23): p. 4867-78.
- [100] **Takahashi, H. and T. Ikeda**, "Transcripts for two members of the transforming growth factor-beta superfamily BMP-3 and BMP-7 are expressed in developing rat embryos", *Dev Dyn*, 1996: 207(4): p. 439-49.
- [101] **Weaver, M., et al.**, "Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development", *Development*, 1999: 126(18): p. 4005-15.
- [102] **Eblaghie, M.C., et al.**, "Evidence that autocrine signaling through Bmpr1a regulates the proliferation, survival and morphogenetic behavior of distal lung epithelial cells", *Dev Biol*, 2006: 291(1): p. 67-82.
- [103] **Sun, J., et al.**, "Prenatal lung epithelial cell-specific abrogation of Alk3-bone morphogenetic protein signaling causes neonatal respiratory distress by disrupting distal airway formation", *Am J Pathol*, 2008: 172(3): p. 571-82.
- [104] **Xu, B., et al.**, "Smad1 and its target gene Wif1 coordinate BMP and Wnt signaling activities to regulate fetal lung development", *Development*: 138(5): p. 925-35.
- [105] **Lee, C.G., et al.**, "Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1-induced pulmonary fibrosis", *J Exp Med*, 2004: 200(3): p. 377-89.

- [106] **Sime, P.J., et al.**, "Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung", *J Clin Invest*, 1997: 100(4): p. 768-76.
- [107] **Kolb, M., et al.**, "Transient transgene expression of decorin in the lung reduces the fibrotic response to bleomycin", *Am J Respir Crit Care Med*, 2001: 163(3 Pt 1): p. 770-7.
- [108] **Lee, C.G., et al.**, "Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1)", *J Exp Med*, 2001: 194(6): p. 809-21.
- [109] **Zhao, J., et al.**, "Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice", *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002: 282(3): p. L585-93.
- [110] **Li, M., et al.**, "Epithelium-specific deletion of TGF-beta receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis", *J Clin Invest*: 121(1): p. 277-87.
- [111] **Annes, J.P., et al.**, "Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1", *J Cell Biol*, 2004: 165(5): p. 723-34.
- [112] **Jenkins, R.G., et al.**, "Ligation of protease-activated receptor 1 enhances alpha(v)beta6 integrin-dependent TGF-beta activation and promotes acute lung injury", *J Clin Invest*, 2006: 116(6): p. 1606-14.
- [113] **Munger, J.S., et al.**, "The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis", *Cell*, 1999: 96(3): p. 319-28.
- [114] **Morris, D.G., et al.**, "Loss of integrin alpha(v)beta6-mediated TGF-beta activation causes Mmp12-dependent emphysema", *Nature*, 2003: 422(6928): p. 169-73.
- [115] **Abreu, J.G., et al.**, "Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta", *Nat Cell Biol*, 2002: 4(8): p. 599-604.
- [116] **Willis, B.C., et al.**, "Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis", *Am J Pathol*, 2005: 166(5): p. 1321-32.
- [117] **Yao, H.W., et al.**, "TGF-beta1 induces alveolar epithelial to mesenchymal transition in vitro", *Life Sci*, 2004: 76(1): p. 29-37.
- [118] **Kasai, H., et al.**, "TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT)", *Respir Res*, 2005: 6: p. 56.
- [119] **Farkas, L., et al.**, "Transient overexpression of Gremlin results in epithelial activation and reversible fibrosis in rat lungs", *Am J Respir Cell Mol Biol*: 44(6): p. 870-8.
- [120] **Myllarniemi, M., et al.**, "Gremlin-mediated decrease in bone morphogenetic protein signaling promotes pulmonary fibrosis", *Am J Respir Crit Care Med*, 2008: 177(3): p. 321-9.
- [121] **Deng, Z., et al.**, "Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene", *Am J Hum Genet*, 2000: 67(3): p. 737-44.
- [122] **Thomson, J., et al.**, "Familial and sporadic primary pulmonary hypertension is caused by BMPR2 gene mutations resulting in haploinsufficiency of the bone morphogenetic protein tuype II receptor", *J Heart Lung Transplant*, 2001: 20(2): p. 149.

- [123] **Song, Y., et al.**, "Increased susceptibility to pulmonary hypertension in heterozygous BMPR2-mutant mice", *Circulation*, 2005: 112(4): p. 553-62.
- [124] **Song, Y., et al.**, "Inflammation, endothelial injury, and persistent pulmonary hypertension in heterozygous BMPR2-mutant mice", *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008: 295(2): p. H677-90.
- [125] **Rosendahl, A., et al.**, "Activation of the TGF-beta/activin-Smad2 pathway during allergic airway inflammation", *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001: 25(1): p. 60-8.
- [126] **Silverman, E.S., et al.**, "Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma", *Am J Respir Crit Care Med*, 2004: 169(2): p. 214-9.
- [127] **Pulleyn, L.J., et al.**, "TGFbeta1 allele association with asthma severity", *Hum Genet*, 2001: 109(6): p. 623-7.
- [128] **Kumar, R.K., C. Herbert, and P.S. Foster**, "Expression of growth factors by airway epithelial cells in a model of chronic asthma: regulation and relationship to subepithelial fibrosis", *Clin Exp Allergy*, 2004: 34(4): p. 567-75.
- [129] **McMillan, S.J. and C.M. Lloyd**, "Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling", *Clin Exp Allergy*, 2004: 34(3): p. 497-507.
- [130] **Chen, W., et al.**, "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3", *J Exp Med*, 2003: 198(12): p. 1875-86.
- [131] **Hansen, G., et al.**, "CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation", *J Clin Invest*, 2000: 105(1): p. 61-70.
- [132] **Hardy, C.L., et al.**, "Interleukin-13 regulates secretion of the tumor growth factor- β superfamily cytokine activin A in allergic airway inflammation", *Am J Respir Cell Mol Biol*: 42(6): p. 667-75.
- [133] **Hardy, C.L., et al.**, "Follistatin is a candidate endogenous negative regulator of activin A in experimental allergic asthma", *Clin Exp Allergy*, 2006: 36(7): p. 941-50.
- [134] **Semitekoulou, M., et al.**, "Activin-A induces regulatory T cells that suppress T helper cell immune responses and protect from allergic airway disease", *J Exp Med*, 2009: 206(8): p. 1769-85.
- [135] **Shin, D., et al.**, "Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish", *Development*, 2007: 134(11): p. 2041-50.
- [136] **Zhang, W., et al.**, "Regulation of Hex gene expression and initial stages of avian hepatogenesis by Bmp and Fgf signaling", *Dev Biol*, 2004: 268(2): p. 312-26.
- [137] **Rossi, J.M., et al.**, "Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm", *Genes Dev*, 2001: 15(15): p. 1998-2009.
- [138] **Weinstein, M., et al.**, "Smad proteins and hepatocyte growth factor control parallel regulatory pathways that converge on beta1-integrin to promote normal liver development", *Mol Cell Biol*, 2001: 21(15): p. 5122-31.
- [139] **Fassler, R. and M. Meyer**, "Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice", *Genes Dev*, 1995: 9(15): p. 1896-908.

- [140] **Antoniou, A., et al.**, "Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9", *Gastroenterology*, 2009: 136(7): p. 2325-33.
- [141] **Clotman, F., et al.**, "Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors", *Genes Dev*, 2005: 19(16): p. 1849-54.
- [142] **Yokomuro, S., et al.**, "Growth control of human biliary epithelial cells by interleukin 6, hepatocyte growth factor, transforming growth factor beta1, and activin A: comparison of a cholangiocarcinoma cell line with primary cultures of non-neoplastic biliary epithelial cells", *Hepatology*, 2000: 32(1): p. 26-35.
- [143] **de Groen, P.C., et al.**, "Characterization and growth regulation of a rat intrahepatic bile duct epithelial cell line under hormonally defined, serum-free conditions", *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998: 34(9): p. 704-10.
- [144] **Ader, T., et al.**, "Transcriptional profiling implicates TGFbeta/BMP and Notch signaling pathways in ductular differentiation of fetal murine hepatoblasts", *Mech Dev*, 2006: 123(2): p. 177-94.
- [145] **Fausto, N., J.S. Campbell, and K.J. Riehle**, "Liver regeneration", *J Hepatol*: 57(3): p. 692-4.
- [146] **Michalopoulos, G.K.**, "Liver regeneration", *J Cell Physiol*, 2007: 213(2): p. 286-300.
- [147] **Bachem, M.G., et al.**, "Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis", *J Clin Invest*, 1992: 89(1): p. 19-27.
- [148] **Saile, B., et al.**, "Transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells", *Hepatology*, 1999: 30(1): p. 196-202.
- [149] **Pinzani, M., et al.**, "Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells", *J Clin Invest*, 1989: 84(6): p. 1786-93.
- [150] **Davis, B.H., U.R. Rapp, and N.O. Davidson**, "Retinoic acid and transforming growth factor beta differentially inhibit platelet-derived-growth-factor-induced Ito-cell activation", *Biochem J*, 1991: 278 (Pt 1): p. 43-7.
- [151] **Davis, B.H.**, "Transforming growth factor beta responsiveness is modulated by the extracellular collagen matrix during hepatic ito cell culture", *J Cell Physiol*, 1988: 136(3): p. 547-53.
- [152] **Czaja, M.J., et al.**, "In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis", *J Cell Biol*, 1989: 108(6): p. 2477-82.
- [153] **Friedman, S.L.**, "Cytokines and fibrogenesis", *Semin Liver Dis*, 1999: 19(2): p. 129-40.
- [154] **Karin, M. and A. Lin**, "NF-kappaB at the crossroads of life and death", *Nat Immunol*, 2002: 3(3): p. 221-7.
- [155] **De Bleser, P.J., et al.**, "Transforming growth factor-beta gene expression in normal and fibrotic rat liver", *J Hepatol*, 1997: 26(4): p. 886-93.

- [156] **Armendariz-Borunda, J., K. Katayama, and J.M. Seyer**, "Transcriptional mechanisms of type I collagen gene expression are differentially regulated by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and transforming growth factor beta in Ito cells", *J Biol Chem*, 1992: 267(20): p. 14316-21.
- [157] **Castilla, A., J. Prieto, and N. Fausto**, "Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy", *N Engl J Med*, 1991: 324(14): p. 933-40.
- [158] **Bissell, D.M., et al.**, "Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation", *J Clin Invest*, 1995: 96(1): p. 447-55.
- [159] **Annoni, G., F.R. Weiner, and M.A. Zern**, "Increased transforming growth factor-beta 1 gene expression in human liver disease", *J Hepatol*, 1992: 14(2-3): p. 259-64.
- [160] **Sanderson, N., et al.**, "Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995: 92(7): p. 2572-6.
- [161] **Kanzler, S., et al.**, "TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis", *Am J Physiol*, 1999: 276(4 Pt 1): p. G1059-68.
- [162] **George, J., et al.**, "In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999: 96(22): p. 12719-24.
- [163] **Galle, P.R., et al.**, "Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage", *J Exp Med*, 1995: 182(5): p. 1223-30.
- [164] **Feldstein, A.E., et al.**, "Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis", *Gastroenterology*, 2003: 125(2): p. 437-43.
- [165] **Inagaki, Y., et al.**, "Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells", *J Cell Physiol*, 2001: 187(1): p. 117-23.
- [166] **Edwards, D.R., et al.**, "Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor", *Embo J*, 1987: 6(7): p. 1899-904.
- [167] **Jirtle, R.L., B.I. Carr, and C.D. Scott**, "Modulation of insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptors and transforming growth factor-beta 1 during liver regeneration", *J Biol Chem*, 1991: 266(33): p. 22444-50.
- [168] **Oe, S., et al.**, "Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration in mice", *Hepatology*, 2004: 40(5): p. 1098-105.
- [169] **Schwall, R.H., et al.**, "Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro", *Hepatology*, 1993: 18(2): p. 347-56.
- [170] **Kogure, K., et al.**, "The role of activin and transforming growth factor-beta in the regulation of organ mass in the rat liver", *Hepatology*, 2000: 31(4): p. 916-21.
- [171] **Luo, J.H., et al.**, "Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas", *Hepatology*, 2006: 44(4): p. 1012-24.

- [172] **Kitisin, K., et al.**, "Disruption of transforming growth factor-beta signaling through beta-spectrin ELF leads to hepatocellular cancer through cyclin D1 activation", *Oncogene*, 2007: 26(50): p. 7103-10.
- [173] **Orsatti, G., et al.**, "Lamellar fibrosis in the fibrolamellar variant of hepatocellular carcinoma: a role for transforming growth factor beta", *Liver*, 1997: 17(3): p. 152-6.
- [174] **Yazumi, S., et al.**, "Disrupted transforming growth factor-beta signaling and deregulated growth in human biliary tract cancer cells", *Int J Cancer*, 2000: 86(6): p. 782-9.
- [175] **Chen, W.X., et al.**, "Quantitative analysis of transforming growth factor beta 1 mRNA in patients with alcoholic liver disease", *World J Gastroenterol*, 2002: 8(2): p. 379-81.
- [176] **Battaglia, S., et al.**, "Liver cancer-derived hepatitis C virus core proteins shift TGF-beta responses from tumor suppression to epithelial-mesenchymal transition", *PLoS One*, 2009: 4(2): p. e4355.
- [177] **Meynard, D., et al.**, "Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload", *Nat Genet*, 2009: 41(4): p. 478-81.
- [178] **Babitt, J.L., et al.**, "Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression", *Nat Genet*, 2006: 38(5): p. 531-9.
- [179] **Viatte, L. and S. Vaulont**, "Hepcidin, the iron watcher", *Biochimie*, 2009: 91(10): p. 1223-8.
- [180] **Weiss, G.**, "Genetic mechanisms and modifying factors in hereditary hemochromatosis", *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*: 7(1): p. 50-8.
- [181] **Houglum, K., et al.**, "Excess iron induces hepatic oxidative stress and transforming growth factor beta1 in genetic hemochromatosis", *Hepatology*, 1997: 26(3): p. 605-10.
- [182] **Dennler, S., et al.**, "Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene", *Embo J*, 1998: 17(11): p. 3091-100.
- [183] **Lin, A.H., et al.**, "Global analysis of Smad2/3-dependent TGF-beta signaling in living mice reveals prominent tissue-specific responses to injury", *J Immunol*, 2005: 175(1): p. 547-54.
- [184] **Monteiro, R.M., et al.**, "Real time monitoring of BMP Smads transcriptional activity during mouse development", *Genesis*, 2008: 46(7): p. 335-46.
- [185] **Scherer, W.F., J.T. Syverton, and G.O. Gey**, "Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix", *J Exp Med*, 1953: 97(5): p. 695-710.
- [186] **Fulwyler, M.J.**, "Electronic separation of biological cells by volume", *Science*, 1965: 150(3698): p. 910-1.
- [187] **Julius, M.H., T. Masuda, and L.A. Herzenberg**, "Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1972: 69(7): p. 1934-8.
- [188] **Goncalves, L.A., A.M. Vigarito, and C. Penha-Goncalves**, "Improved isolation of murine hepatocytes for in vitro malaria liver stage studies", *Malar J*, 2007: 6: p. 169.

- [189] **Southern, E.M.**, "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis", *J Mol Biol*, 1975: 98(3): p. 503-17.
- [190] **Temin, H.M. and S. Mizutani**, "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus", *Nature*, 1970: 226(5252): p. 1211-3.
- [191] **Nolan, T., R.E. Hands, and S.A. Bustin**, "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR", *Nat Protoc*, 2006: 1(3): p. 1559-82.
- [192] **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon**, "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979: 76(9): p. 4350-4.
- [193] **Renart, J., J. Reiser, and G.R. Stark**, "Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979: 76(7): p. 3116-20.
- [194] **Fazekas de St Groth, S., R.G. Webster, and A. Datyner**, "Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips", *Biochim Biophys Acta*, 1963: 71: p. 377-91.
- [195] **Laemmli, U.K.**, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 1970: 227(5259): p. 680-5.
- [196] **Weber, K. and M. Osborn**, "The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis", *J Biol Chem*, 1969: 244: p. 4406-4412.
- [197] **Reynolds, J. and C. Tanford**, "The cross conformation of protein-sodium dodecyl sulphate complexes", *J Biol Chem*, 1970: 245: p. 5161-5165.
- [198] **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon**, "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979: 76: p. 4350-4354.
- [199] **Burnette, W.N.**, "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A", *Anal Biochem*, 1981: 112(2): p. 195-203.
- [200] **Whitehead, T., D. Bullock, and T. Carter**, "High-density lipoprotein cholesterol analysis", *Clin Chem*, 1979: 25: p. 1531-1546.
- [201] **Legocki, R. and D. Verma**, "Multiple immunoreplica technique: Screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel", *Annal Biochem*, 1981: 111: p. 385-392.
- [202] **Kaufmann, S., C. Ewing, and J. Shaper**, "The erasable western blot", *Annal Biochem*, 1987: 161: p. 89-95.
- [203] **Plopper, C.G., et al.**, "Early events in naphthalene-induced acute Clara cell toxicity. II. Comparison of glutathione depletion and histopathology by airway location", *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001: 24(3): p. 272-81.
- [204] **Walters, D.M. and S.R. Kleeberger**, "Mouse models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis", *Curr Protoc Pharmacol*, 2008: Chapter 5: p. Unit 5 46.

- [205] **Zosky, G.R. and P.D. Sly**, "Animal models of asthma", *Clin Exp Allergy*, 2007: 37(7): p. 973-88.
- [206] **Mitchell, C. and H. Willenbring**, "A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice", *Nat Protoc*, 2008: 3(7): p. 1167-70.
- [207] **Sokolovic, M., et al.**, "The transcriptomic signature of fasting murine liver", *BMC Genomics*, 2008: 9: p. 528.
- [208] **Tiegs, G., J. Hentschel, and A. Wendel**, "A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A", *J Clin Invest*, 1992: 90(1): p. 196-203.
- [209] **Campbell, R.E., et al.**, "A monomeric red fluorescent protein", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002: 99(12): p. 7877-82.
- [210] **Sountoulidis, A., et al.**, "Activation of the canonical Bone Morphogenetic Protein (BMP) pathway during lung morphogenesis and adult lung tissue repair", *PLoS One*: 7(8): p. e41460.
- [211] **Speletas, M., et al.**, "Foxp3 expression in liver correlates with the degree but not the cause of inflammation", *Mediators Inflamm*: 2011: p. 827565.
- [212] **Adamson, I.Y. and D.H. Bowden**, "The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice", *Am J Pathol*, 1974: 77(2): p. 185-97.
- [213] **Kalluri, R. and E.G. Neilson**, "Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis", *J Clin Invest*, 2003: 112(12): p. 1776-84.
- [214] **Willis, B.C. and Z. Borok**, "TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease", *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007: 293(3): p. L525-34.
- [215] **Zavadil, J. and E.P. Bottinger**, "TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions", *Oncogene*, 2005: 24(37): p. 5764-74.
- [216] **Xu, J., S. Lamouille, and R. Derynck**, "TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition", *Cell Res*, 2009: 19(2): p. 156-72.
- [217] **Morin, R., et al.**, "Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing", *Biotechniques*, 2008: 45(1): p. 81-94.
- [218] **Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder**, "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics", *Nat Rev Genet*, 2009: 10(1): p. 57-63.
- [219] **Crapo, J.D., et al.**, "Cell number and cell characteristics of the normal human lung", *Am Rev Respir Dis*, 1982: 126(2): p. 332-7.
- [220] **Anders, S. and W. Huber**, "Differential expression analysis for sequence count data", *Genome Biol*: 11(10): p. R106.
- [221] **Braeuning, A., et al.**, "Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes", *Febs J*, 2006: 273(22): p. 5051-61.
- [222] **Zhan, H.C., D.P. Liu, and C.C. Liang**, "Insulator: from chromatin domain boundary to gene regulation", *Hum Genet*, 2001: 109(5): p. 471-8.
- [223] **Miyazono, K., K. Kusanagi, and H. Inoue**, "Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling", *J Cell Physiol*, 2001: 187(3): p. 265-76.

- [224] **Yamamoto, M., et al.**, "Antagonism between Smad1 and Smad2 signaling determines the site of distal visceral endoderm formation in the mouse embryo", *J Cell Biol*, 2009: 184(2): p. 323-34.
- [225] **Massague, J. and Y.G. Chen**, "Controlling TGF-beta signaling", *Genes Dev*, 2000: 14(6): p. 627-44.
- [226] **Leeuwis, J.W., et al.**, "Direct visualization of Smad1/5/8-mediated transcriptional activity identifies podocytes and collecting ducts as major targets of BMP signalling in healthy and diseased kidneys", *J Pathol*: 224(1): p. 121-32.
- [227] **He, X.C., et al.**, "BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling", *Nat Genet*, 2004: 36(10): p. 1117-21.
- [228] **Haramis, A.P., et al.**, "De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine", *Science*, 2004: 303(5664): p. 1684-6.
- [229] **Koyama, S.Y. and D.K. Podolsky**, "Differential expression of transforming growth factors alpha and beta in rat intestinal epithelial cells", *J Clin Invest*, 1989: 83(5): p. 1768-73.
- [230] **Potten, C.S., et al.**, "Stimulation and inhibition of proliferation in the small intestinal crypts of the mouse after in vivo administration of growth factors", *Gut*, 1995: 36(6): p. 864-73.
- [231] **Hahn, S.A., et al.**, "Allelotype of pancreatic adenocarcinoma using xenograft enrichment", *Cancer Res*, 1995: 55(20): p. 4670-5.
- [232] **Brorson, M., et al.**, "Expression of SMAD signal transduction molecules in the pancreas", *Histochem Cell Biol*, 2001: 116(3): p. 263-7.
- [233] **Yamamoto, T., et al.**, "Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis", *Kidney Int*, 1994: 45(3): p. 916-27.
- [234] **Simic, P. and S. Vukicevic**, "Bone morphogenetic proteins in development and homeostasis of kidney", *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005: 16(3): p. 299-308.
- [235] **Hauri-Hohl, M.M., et al.**, "TGF-beta signaling in thymic epithelial cells regulates thymic involution and postirradiation reconstitution", *Blood*, 2008: 112(3): p. 626-34.
- [236] **Bleul, C.C. and T. Boehm**, "BMP signaling is required for normal thymus development", *J Immunol*, 2005: 175(8): p. 5213-21.
- [237] **Morrisey, E.E. and B.L. Hogan**, "Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development", *Dev Cell*: 18(1): p. 8-23.
- [238] **Bhaskaran, M., et al.**, "Trans-differentiation of alveolar epithelial type II cells to type I cells involves autocrine signaling by transforming growth factor beta 1 through the Smad pathway", *J Biol Chem*, 2007: 282(6): p. 3968-76.
- [239] **Kim, K.K., et al.**, "Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis", *J Clin Invest*, 2009: 119(1): p. 213-24.
- [240] **Reynolds, S.D., et al.**, "Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration", *Am J Pathol*, 2000: 156(1): p. 269-78.

- [241] **Benhamouche, S., et al.**, "Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver", *Dev Cell*, 2006: 10(6): p. 759-70.
- [242] **Kremer, M., et al.**, "Pivotal role of Smad3 in a mouse model of T cell-mediated hepatitis", *Hepatology*, 2008: 47(1): p. 113-26.

Παράρτημα Ι. Διαφορική έκφραση των υπό μελέτη πληθυσμών ηπατοκυττάρων

Gene	Fold difference		
	RFP ⁺ /NEG	RFP ⁺ GFP ⁺ /NEG	GFP ⁺ / NEG
Gp2	Inf*	#Δ/Y**	Inf
Cela3b	Inf	Inf	Inf
Rnase1	Inf	Inf	Inf
Pnlip	411.4719	1616.913	156.0239
Dio3	20.78902	#Δ/Y	11.73889
Elovl3	17.03308	18.92239	14.07362
Susd4	14.09572	21.26219	16.79535
Hsd3b5	13.0255	11.35095	11.21797
Sp5	12.21837	22.09268	11.63758
D630003M21Rik	11.90258	19.10747	13.96941
Slc1a2	11.55355	20.84223	13.03934
Cyp2c38	9.773611	9.501291	6.589275
Slc13a3	9.52117	13.98197	9.89915
Rdh9	8.465192	8.981588	6.297018
Lgr5	8.35616	13.41583	11.61273
Cyp2a5	7.779309	12.046	7.711412
Lhpp	7.762481	10.64365	7.007909
Oat	7.691383	12.59759	8.630214
Gm4794	7.54241	6.586018	5.416208
Cyp1a1	7.520372	#Δ/Y	5.307058
Cyp2d9	7.391021	8.948947	6.039066
Rhbg	6.890559	9.723645	6.376241
Cyp2e1	6.850687	7.803809	6.515111
Pcp4l1	6.373513	8.784715	6.07112
Rcan2	6.317043	11.30999	8.176649
Gulo	6.264995	7.869304	6.018253
Sult3a1	6.198639	7.248142	5.621066
Glul	6.021874	9.876149	6.029951
Nfe2l3	5.921372	8.303163	9.992768
Slco1a1	5.892866	6.243905	5.981453
Cib2	5.617896	6.743912	3.757051
Slc22a3	5.594262	13.21217	8.443906
Fam55b	5.561211	7.052601	6.281503
Serpina7	5.144499	6.226844	5.748838
Olig1	5.132069	6.097894	3.941792
Cyp1a2	5.040308	6.074079	4.810412
Gm11992	4.828731	4.138478	3.066501
Vldlr	4.751489	7.508342	5.395658
Lect2	4.744271	5.403296	4.473882
Endod1	4.539125	4.903461	4.023939
Npr2	4.493953	5.240222	3.685274

Tnfrsf19	4.275406	10.63757	6.37102
Slc22a29	4.205877	6.415494	5.329802
Csad	4.133959	4.366088	3.607167
Fitm1	4.104319	4.801939	3.80913
Ang	4.00097	4.758378	3.870996
Cyp3a16	3.99486	4.44435	4.283508
Cyp2g1	3.970103	3.720064	2.551136
Tbx3	3.916982	6.091083	4.951256
Gstm2	3.896463	4.734409	3.631578
Cyp2c37	3.865186	4.395785	3.591292
Cyp2a22	3.853627	5.264364	4.072818
Cyp3a41a	3.66028	3.450625	3.173327
Hspb1	3.568352	3.45265	2.532061
Rnase4	3.501775	4.054977	3.437072
Pfn2	3.494814	4.464889	3.089682
Cyp7b1	3.472317	3.874074	3.567948
Avpr1a	3.440652	3.825182	3.302192
Cyp2c50	3.41754	3.648064	3.393742
E2f8	3.344428	3.644933	2.898116
Rnf186	3.282629	3.476869	2.647304
Gstm3	3.274486	3.823429	2.883744
Pdk4	3.239866	3.252938	2.385007
Esrrg	3.221507	5.100149	3.919371
Slc22a1	3.218674	3.886338	2.941262
Slc1a4	3.208215	4.455996	3.552135
Ces2c	3.202998	4.099365	2.833508
1700009P17Rik	3.1693	#Δ/Y	2.659358
Tpm2	3.080629	4.184934	3.08171
Egln3	3.077755	3.272488	2.619267
Proca1	3.046202	#Δ/Y	1.682986
Axin2	3.042248	5.106735	4.331222
Cyp2c54	2.963909	3.019804	2.866283
Cyp2c69	2.896491	2.503553	2.402377
Cyp2c67	2.893802	3.250229	3.037656
Cldn2	2.886377	3.274068	3.0453
Pparg	2.834987	3.374974	2.416971
Aldh3a2	2.804214	3.229648	2.734633
Notum	2.769048	3.142265	2.536418
Fam89a	2.766177	3.315161	2.687036
Slc16a10	2.740005	3.632958	3.094023
1810058I24Rik	2.722897	2.99907	2.503234
Akr1c6	2.708087	2.799053	2.614384
Cyp2c39	2.630865	2.753397	2.413955
Fbxl21	2.57073	2.952251	2.526714

Hsd3b2	2.543812	2.387078	2.794162
Gadd45a	2.523434	2.24193	1.492937
Pon1	2.496724	2.539821	2.373216
Fam82a1	2.493209	2.8958	2.638217
Ube2e2	2.487212	2.746471	2.174997
Adh4	2.47954	2.964842	2.779581
Slco1b2	2.471083	2.738808	2.603203
Cldn14	2.467759	1.570041	1.246733
Pla2g12a	2.467146	1.861668	1.793171
Hspb6	2.455991	2.863173	2.042063
Atp6v0d2	2.431259	2.74707	2.672941
Wee1	2.394043	#Δ/Y	1.601199
Pdilt	2.390978	1.926276	1.866184
Gstm6	2.366328	2.63167	2.140443
Blvrb	2.360556	2.6152	1.887632
Rgn	2.359301	2.634555	2.456719
Mup10	2.353574	2.878635	2.268678
Tnfaip8l1	2.351864	2.846844	2.352479
Csrp3	2.314154	2.488079	2.00906
Cyp3a11	2.290883	2.574266	2.348924
Syt1	2.248767	2.433277	2.538112
Aqp9	2.244429	2.387842	2.214887
Cyp27a1	2.233503	2.090298	1.999337
Spc24	2.21536	1.900986	1.532998
Slc16a11	2.212971	2.755687	1.925913
Ndrp1	2.209635	#Δ/Y	1.874822
Tdrkh	2.176221	2.218027	2.311412
Plk3	2.173657	1.894262	1.418253
Gemin6	2.172336	#Δ/Y	1.821352
Mt1	2.170813	#Δ/Y	1.145836
Car1	2.163123	3.143654	2.816152
Ces3a	2.153252	2.072733	2.032916
Ugt3a1	2.150145	2.341864	1.933683
Por	2.143381	2.511732	1.855415
Enho	2.131209	#Δ/Y	1.777582
Ptp4a1	2.129193	1.605495	1.436425
Serpina6	2.128743	2.659467	2.249921
Ociad2	2.118858	2.450332	2.162975
Pir	2.114727	2.067189	1.818065
Hsd3b3	2.097581	2.06583	2.015815
Casc4	2.071108	2.690287	1.972502
Gadd45b	2.06913	#Δ/Y	1.369154
Ccdc157	2.065694	2.617026	2.592979
Nrn1	2.060279	2.191826	1.840668

Ccdc162	2.050338	2.064093	2.079821
Alas2	2.031828	2.088008	2.041656
Ahr	2.029042	2.261836	2.032905
Aurka	2.012308	#Δ/Y	1.223108
Cyp2c29	2.00519	2.157131	2.00553
Gpr110	1.996552	1.946001	2.399209
Coq10a	1.990976	1.913773	1.653669
Stra13	1.941964	1.654607	1.529161
Rasl11b	1.936155	#Δ/Y	1.275427
Tlr5	1.935182	2.532131	2.356262
Myc	1.934794	#Δ/Y	0.908292
Cyb5	1.931445	1.975106	1.762857
Dusp28	1.931003	#Δ/Y	1.50951
Socs2	1.929755	2.034938	1.719322
Rnf43	1.916885	2.374803	2.050693
4930420K17Rik	1.910288	2.117974	1.941112
Nr1i3	1.902178	1.997289	1.768249
Aldh1a1	1.901985	2.239337	1.974098
Spc25	1.892773	#Δ/Y	1.152379
Hamp	1.886554	#Δ/Y	1.558055
Tsc22d1	1.877224	2.331791	1.881579
Ugt2b1	1.874064	1.930799	1.894004
Mgst1	1.865901	1.880178	1.734426
Prodh	1.855547	2.02009	1.67703
Fam107b	1.847355	1.93842	1.715029
Plbd1	1.839225	2.060315	1.781665
Slc17a8	1.837117	#Δ/Y	2.109723
Acot8	1.830849	#Δ/Y	1.232741
D630039A03Rik	1.827174	2.217777	1.85204
1500003O03Rik	1.81406	1.824172	1.690726
Aox1	1.813907	#Δ/Y	1.762369
Uck2	1.811461	#Δ/Y	1.091463
Sord	1.811024	1.927003	1.732989
Akr1c20	1.810427	1.900198	1.704398
Stbd1	1.807722	2.057702	1.685649
Gstm1	1.804137	1.676245	1.468481
Ugt1a6b	1.802936	1.877657	2.11144
Hspa2	1.802838	#Δ/Y	1.424592
Hsd3b7	1.798319	1.780112	1.649021
Gsta3	1.797328	2.032792	1.737336
Nfkbia	1.792061	#Δ/Y	1.116815
Ces1d	1.786617	1.572762	1.427271
Tmem97	1.785681	1.821313	1.556361
Snhg6	1.784466	#Δ/Y	1.440024

AW112010	1.775565	1.827054	1.633129
Fam134b	1.770077	1.816333	1.420519
Gm3219	1.765756	#Δ/Y	1.301896
Tk1	1.763981	1.580572	1.402566
Car3	1.760135	2.007646	1.804076
Pim1	1.759533	#Δ/Y	1.122349
Ugt1a6a	1.758198	1.750513	1.738928
H3f3b	1.751192	#Δ/Y	1.307229
Amigo2	1.74837	1.67278	1.297031
Pnrc1	1.742996	1.524225	1.336959
Ncald	1.742509	2.161378	1.890294
Gbp10	1.733433	2.366063	2.492854
BC013529	1.730234	1.624847	1.526789
Comt	1.726144	1.698159	1.564725
Txnl4b	1.723588	1.548941	1.320317
Nfil3	1.711857	1.473935	1.270501
Zbtb2	1.707981	#Δ/Y	1.048917
Pltp	1.707329	#Δ/Y	1.329833
Cml2	1.695429	1.870332	1.780997
Slc25a21	1.685922	2.190159	1.675831
Gm10768	1.684388	1.804006	1.789609
9530008L14Rik	1.681747	1.827398	1.556986
Aspscr1	1.681245	1.682072	1.419015
Clp1	1.68081	1.532701	1.454033
Mbl1	1.677833	1.715493	1.553659
9030619P08Rik	1.677388	1.555592	1.248863
Mrap	1.676652	1.450155	1.292377
Tgfa	1.675688	1.871518	1.646598
Irs2	1.67473	1.712725	1.383517
G630090E17Rik	1.673133	#Δ/Y	1.487706
1300014I06Rik	1.665376	1.799888	1.503226
Nceh1	1.66392	1.787248	1.997198
Alad	1.663789	1.760928	1.499072
Nrbf2	1.663059	1.552185	1.457811
Car2	1.66249	1.909969	1.657743
Krt8	1.659074	#Δ/Y	1.160857
Bdh1	1.657592	1.753085	1.582835
Rdh16	1.656088	1.849642	1.640195
Ptpn2	1.655211	#Δ/Y	1.253029
0610011F06Rik	1.654804	1.467898	1.372507
Klf11	1.653408	1.951002	1.650913
Grpel2	1.650709	1.775548	1.442236
Cdo1	1.64969	1.648614	1.615519
Fam25c	1.649033	#Δ/Y	1.271571

Thnsl2	1.647457	1.609728	1.583505
Slc19a2	1.647429	1.917298	1.791745
Cyp3a44	1.645824	1.395313	1.530649
Igfbp1	1.644322	#Δ/Y	1.300699
Zfp295	1.643058	#Δ/Y	1.143944
Serpinb1a	1.640755	2.409972	1.981001
Sc4mol	1.637851	1.601446	1.516354
Cxcl1	1.636907	#Δ/Y	1.115277
Mrps18a	1.634068	#Δ/Y	1.479556
BC048546	1.633774	1.723192	1.713523
Fmo2	1.631855	2.613921	2.373112
Sult1b1	1.624583	1.637976	1.682515
Pnp	1.618122	1.436095	1.354682
Nudt2	1.617555	#Δ/Y	1.256565
Ccdc107	1.615446	#Δ/Y	1.378636
Id2	1.614754	1.502805	1.236881
Hint2	1.606612	1.694019	1.306578
Csrp2	1.602133	1.596463	1.171642
Aox3	1.602115	1.697633	1.812727
Fas	1.599134	1.475864	1.385843
Sult2a2	1.589782	#Δ/Y	1.409893
Rps26	1.587477	1.45439	1.358323
Nqo1	1.585517	#Δ/Y	1.358471
Cyb5d2	1.584746	#Δ/Y	1.352754
Cyp2c68	1.584336	1.53972	1.584418
Atp6v1h	1.582549	1.536901	1.387045
D10Wsu102e	1.581797	#Δ/Y	0.857378
Mrpl35	1.576723	1.569968	1.750368
Bach1	1.573304	#Δ/Y	1.058302
Prdx6	1.572404	1.50801	1.434873
Idh3a	1.570936	1.770412	1.512517
Sod1	1.570168	1.536955	1.359966
Rps28	1.568939	#Δ/Y	1.117939
Aldh2	1.567302	1.675489	1.431541
Ces1c	1.566252	1.505358	1.460157
Rpl37	1.564507	#Δ/Y	1.23896
Kdsr	1.563437	#Δ/Y	1.428982
Dusp6	1.563095	1.585056	1.411247
Grtp1	1.559171	1.646909	1.587372
Nsdhl	1.557755	1.43743	1.40838
Lrrc8a	1.555906	#Δ/Y	1.246822
Gas5	1.554397	#Δ/Y	1.302886
Rplp2	1.554032	#Δ/Y	1.189245
2810007J24Rik	1.551961	1.754963	1.809156

Hpd	1.551158	1.683254	1.502014
Tor2a	1.551092	#Δ/Y	1.32365
Trp53inp1	1.55091	#Δ/Y	1.289349
Mrps34	1.550154	#Δ/Y	1.18154
Arhgef19	1.546395	1.774203	1.530272
Gde1	1.5446	#Δ/Y	1.211928
Fdps	1.544131	1.466517	1.402412
Apcs	1.543481	#Δ/Y	1.382666
Map1lc3a	1.540994	#Δ/Y	1.040743
Isoc2a	1.539981	1.580907	1.274799
Rpl35a	1.539942	#Δ/Y	1.271967
Sult1d1	1.539478	1.705232	1.601186
Psm1	1.538295	1.492018	1.36823
Metap1d	1.537801	1.651861	1.617011
Olfr856-ps1	1.536406	#Δ/Y	1.407484
Cdh2	1.53569	1.781489	1.66714
Psm7	1.535106	1.438322	1.319693
Tst	1.534854	1.535879	1.407954
Rps19	1.533704	#Δ/Y	1.049856
Fam96b	1.533221	1.713647	1.418345
Ces1g	1.527217	#Δ/Y	1.325572
Rab3ip	1.526848	#Δ/Y	1.262056
Apoa2	1.520144	1.460819	1.287942
Pdp2	1.519234	1.927973	1.695182
Ubl5	1.516137	1.745928	1.302695
Rps27l	1.515709	1.455987	1.351374
Spp2	1.514558	1.39732	1.280485
Trmt112	1.51429	#Δ/Y	1.327137
Mrpl33	1.513549	#Δ/Y	1.377369
Inmt	1.512169	1.77506	1.455852
Rps20	1.510515	#Δ/Y	1.168526
2810428l15Rik	1.505386	#Δ/Y	1.255902
Tex264	1.501584	1.532227	1.273594
Slc16a7	1.500595	1.633719	1.493051
Psm1	1.50012	1.436192	1.32126
Tmem19	1.497102	1.654805	1.476112
Ces1b	1.496637	#Δ/Y	1.254122
Prdx1	1.495538	1.413584	1.334884
Apool	1.493898	#Δ/Y	1.273958
Psm3	1.493643	1.536843	1.327158
Nt5e	1.492564	1.50298	1.416092
Fdft1	1.491895	1.419391	1.320526
Dnajb4	1.491071	#Δ/Y	1.286984
Rarres1	1.491016	#Δ/Y	1.312189

Anxa7	1.49083	1.489593	1.3844
Rps17	1.490803	#Δ/Y	1.187878
Ugt2b34	1.488254	1.433377	1.447405
0910001L09Rik	1.488024	1.801615	1.244768
Mosc2	1.487852	1.514726	1.375584
Pah	1.486694	1.646861	1.549017
Rps25	1.486503	#Δ/Y	1.256206
Hpgd	1.485576	1.510856	1.485789
Mif4gd	1.48478	#Δ/Y	1.271433
Agmo	1.482513	1.536	1.507458
Rpl37a	1.480775	#Δ/Y	1.176237
Dlat	1.480126	1.662664	1.409064
Rpl27a	1.478828	#Δ/Y	1.281498
Mrps28	1.478269	#Δ/Y	1.240963
Dcxr	1.476795	#Δ/Y	1.174483
Psmb6	1.476654	1.563859	1.238848
Prdx3	1.476613	1.557929	1.466412
Tmem5	1.475251	#Δ/Y	1.057446
Aars	1.47364	1.607684	1.481525
Nop10	1.472798	#Δ/Y	1.211073
Bhlhe40	1.472736	#Δ/Y	1.113381
0610007P14Rik	1.471818	1.547184	1.416159
Akr1c12	1.470448	1.548975	1.412531
Mvk	1.47043	1.489696	1.345511
Wdr45	1.469832	1.474549	1.374579
Tapt1	1.469451	1.493876	1.544535
Rpl36	1.467805	#Δ/Y	1.128809
Akr7a5	1.466796	#Δ/Y	1.142734
Hsp90aa1	1.466178	1.538214	1.618828
Timm8a1	1.46382	#Δ/Y	1.242498
Txn1	1.463423	1.445805	1.282672
Tubb2c	1.460512	#Δ/Y	1.28254
Cideb	1.459616	1.566152	1.340938
Eif4ebp1	1.459072	#Δ/Y	1.163031
Ccs	1.458771	1.599378	1.247067
Ddt	1.45855	#Δ/Y	1.265496
Amy1	1.458324	#Δ/Y	1.388098
Trib1	1.458099	#Δ/Y	1.107226
Rps24	1.457551	#Δ/Y	1.270208
Cops5	1.456868	#Δ/Y	1.323447
Il1rap	1.456781	1.387575	1.51534
Rps5	1.456012	#Δ/Y	1.146214
Psma5	1.455662	1.51298	1.315112
Psmd3	1.455014	1.413228	1.286177

Rpl32	1.454116	#Δ/Y	1.135016
Mettl7b	1.454089	#Δ/Y	1.286064
Cib1	1.453883	#Δ/Y	1.277357
Ran	1.453883	#Δ/Y	1.225174
Pid1	1.452488	1.588534	1.537998
Tm2d2	1.451787	#Δ/Y	1.170702
BC004004	1.450631	#Δ/Y	1.249237
Ptplad1	1.448736	1.520941	1.526729
Tmem85	1.44764	#Δ/Y	1.273258
Rpl17	1.446849	#Δ/Y	1.22443
Ube2l6	1.446732	1.499783	1.478734
Cmb1	1.446085	1.518112	1.39804
Rpl28	1.445854	#Δ/Y	1.168736
Cd302	1.444105	1.466419	1.363717
Rpl39	1.44397	#Δ/Y	1.193787
Polr1d	1.443733	#Δ/Y	1.195473
Adrm1	1.442091	1.422312	1.234419
Nit2	1.44177	1.458727	1.355288
Pex16	1.440388	1.487767	1.213898
Anpep	1.440221	1.425234	1.368869
Tmem134	1.436713	#Δ/Y	1.091932
Acsm1	1.435565	1.499245	1.413881
Rpl14	1.435491	#Δ/Y	1.251269
Sgk2	1.435484	1.513693	1.233786
Rps18	1.434983	1.403236	1.166762
Dhrs1	1.43436	1.462606	1.409151
Nudc	1.432561	1.525667	1.266899
Naprt1	1.432164	1.473993	1.253687
Cltb	1.430255	#Δ/Y	1.16477
Lipc	1.430075	#Δ/Y	1.236915
Ces2e	1.428992	#Δ/Y	1.310244
Brp44l	1.428981	#Δ/Y	1.315161
Tspan12	1.428558	1.552046	1.431368
Cs	1.426213	1.511325	1.445043
Irf2bp2	1.42517	#Δ/Y	1.268901
Tm7sf2	1.424793	#Δ/Y	1.191876
Gstk1	1.422558	#Δ/Y	1.280356
Mpdu1	1.418808	#Δ/Y	1.177188
Colec12	1.418404	1.371549	1.431478
Hist1h2bc	1.417922	#Δ/Y	1.345641
Pdzk1	1.416501	1.445661	1.324282
Eps8l2	1.415484	1.577953	1.439552
Psma6	1.415216	1.487676	1.323153
Dhfr	1.415115	#Δ/Y	1.3259

Pomp	1.414448	1.451736	1.34083
Cd1d1	1.412604	#Δ/Y	1.319366
Rplp1	1.412112	#Δ/Y	1.046875
Gchfr	1.411457	#Δ/Y	1.062497
Rpl22	1.407956	#Δ/Y	1.173559
Psmc2	1.407815	1.50838	1.442446
Rpl31	1.407416	#Δ/Y	1.12622
Grina	1.407007	#Δ/Y	1.147137
Cdc34	1.406725	#Δ/Y	1.089884
March5	1.406266	#Δ/Y	1.289618
Rpl11	1.404983	#Δ/Y	1.085744
Rpl10a	1.403928	#Δ/Y	1.15874
Rps10	1.402942	#Δ/Y	1.021423
Pemt	1.400244	#Δ/Y	1.139019
Psemb7	1.399075	1.625833	1.289829
Rps4x	1.399061	#Δ/Y	1.174454
Agmat	1.397875	#Δ/Y	1.216847
Tbca	1.394875	1.526699	1.288436
Ugt3a2	1.394754	1.398595	1.364078
Psmc12	1.394662	#Δ/Y	1.37275
Rps13	1.394479	#Δ/Y	1.103435
C4bp	1.393966	1.450637	1.471852
Rpl18	1.390758	#Δ/Y	1.083709
Psemb4	1.390423	#Δ/Y	1.180433
Rps8	1.386317	#Δ/Y	1.116023
Ubxn1	1.386278	1.463757	1.229896
Serpina10	1.386144	1.412513	1.395016
Glyat	1.38545	1.408276	1.425766
Hsd17b10	1.385377	#Δ/Y	1.236663
Psmc8	1.384762	#Δ/Y	1.205493
Tmem205	1.38473	#Δ/Y	1.164415
Skp1a	1.384483	1.412727	1.280507
Mbl2	1.38323	#Δ/Y	1.317397
Sar1b	1.381911	#Δ/Y	1.24855
Sepx1	1.381612	1.56399	1.231281
Naca	1.380054	#Δ/Y	1.230692
Gstz1	1.378248	1.387934	1.333948
Psmc3	1.374376	#Δ/Y	1.323154
Dstn	1.372677	#Δ/Y	1.357877
Mocs1	1.372107	1.407998	1.234945
Asgr1	1.366993	#Δ/Y	1.197316
Rpl7a	1.365817	#Δ/Y	1.15164
Rpl7	1.364492	#Δ/Y	1.204125
Uba52	1.362929	#Δ/Y	1.091159

Ugt2b36	1.361832	#Δ/Y	1.315216
Ttr	1.361653	#Δ/Y	1.18198
Ass1	0.724122	0.617355	0.702242
Ctnnd1	0.7232	#Δ/Y	0.891911
Cps1	0.722019	0.643552	0.882435
Srrm2	0.719194	#Δ/Y	0.919343
Wnk1	0.717629	#Δ/Y	0.903055
Tars	0.714854	0.654665	0.778791
Dennd5a	0.713707	#Δ/Y	0.654306
Psd3	0.71255	#Δ/Y	0.94664
Flnb	0.706601	0.701123	0.811961
Ash1l	0.704736	#Δ/Y	0.936656
Golgb1	0.7026	#Δ/Y	1.001521
Prrc2b	0.702058	#Δ/Y	0.774064
Masp1	0.699153	#Δ/Y	0.865825
Snrk	0.698795	0.702033	0.716358
Birc6	0.6982	#Δ/Y	0.937983
St6gal1	0.696982	0.536162	0.702128
Pip5k1c	0.696554	0.644853	0.637838
D14Abb1e	0.695859	#Δ/Y	0.939684
Ep300	0.695459	#Δ/Y	0.853073
Ranbp2	0.693882	#Δ/Y	0.968034
Nr2f2	0.693764	#Δ/Y	0.827196
Irf7	0.692463	0.639259	0.617326
Nipal1	0.689863	#Δ/Y	0.824393
Mib1	0.689439	#Δ/Y	0.895698
Arid2	0.689307	#Δ/Y	0.874022
Man2b2	0.688744	0.596105	0.621
Rasgef1b	0.688742	0.424152	0.474724
Phc3	0.687346	#Δ/Y	0.826435
Tnrc6a	0.687081	#Δ/Y	1.014553
Dicer1	0.686933	#Δ/Y	0.846037
Abl1	0.684374	0.695213	0.720423
Slc9a3r2	0.68386	0.615768	0.401152
Adar	0.683032	0.689903	0.844624
Fryl	0.682574	#Δ/Y	0.780418
Cmah	0.682352	#Δ/Y	1.059228
Fkbp9	0.680167	0.61607	0.599747
Sbf2	0.674934	#Δ/Y	0.833331
Arap2	0.674659	0.662285	0.712266
Thoc2	0.673883	#Δ/Y	0.980062
Spna2	0.673611	0.687401	0.723112
Lrp6	0.672263	0.687573	0.782967
Myh9	0.671166	0.627266	0.679628

Iqsec1	0.670864	0.641197	0.695919
BC016423	0.670339	#Δ/Y	0.916631
Spn	0.66954	#Δ/Y	0.791495
Mug2	0.669424	0.500466	0.72048
BC006779	0.669247	0.66663	0.721413
D5Erttd579e	0.668519	#Δ/Y	0.928419
Mtap4	0.666657	0.703744	0.672492
Glce	0.66501	#Δ/Y	0.80645
Sh3bp5	0.664547	0.673635	0.663935
Lpp	0.664094	#Δ/Y	0.894209
Plekhb2	0.66314	0.635992	0.66471
Asxl2	0.660386	#Δ/Y	0.995422
Gab1	0.657028	#Δ/Y	0.744568
Tnrc18	0.656918	#Δ/Y	0.678813
Bptf	0.656768	#Δ/Y	0.75457
Fchsd2	0.656706	0.679858	0.703526
Arid1a	0.65638	#Δ/Y	0.706161
Dyrk2	0.655113	#Δ/Y	0.730215
Ston2	0.65403	#Δ/Y	0.840875
Trio	0.653088	#Δ/Y	0.801425
Ppp1r12a	0.652843	#Δ/Y	0.796211
Fam46a	0.648006	0.598136	0.732992
Strn	0.647476	#Δ/Y	0.817293
Parp14	0.645979	0.610978	0.751501
Fam178a	0.645573	0.669466	0.806462
Heatr5a	0.645457	#Δ/Y	0.776978
Tep1	0.645185	#Δ/Y	0.787319
Malat1	0.643361	#Δ/Y	0.820594
Apc	0.64291	0.653834	0.724677
Uroc1	0.642668	0.508374	0.602461
Trip11	0.642475	0.664166	0.94709
Xist	0.641914	#Δ/Y	0.921544
Acap2	0.641414	#Δ/Y	0.740174
Coro1c	0.639346	0.653578	0.557873
Mll2	0.637925	0.72211	0.752169
Prkca	0.637758	0.640149	0.704039
Acaca	0.637498	0.568885	0.804838
Clasp2	0.635799	#Δ/Y	0.699811
Armcx3	0.63578	0.587055	0.669794
Zmiz1	0.635082	0.636217	0.654415
Prpf40b	0.634769	0.66105	0.657297
Dync1h1	0.634754	0.706003	0.732495
Etnk1	0.634578	0.593643	0.690846
Herc1	0.633534	0.694723	0.761404

Eef2k	0.633268	#Δ/Y	0.785943
Ralgapa2	0.631297	#Δ/Y	0.817574
Fam117b	0.630721	0.53759	0.575086
Setx	0.629697	0.670898	0.846492
Tln1	0.629092	#Δ/Y	0.690612
Notch2	0.626918	0.631481	0.705166
Svil	0.626733	0.578034	0.737771
Ern1	0.625833	0.689654	0.780201
Notch1	0.625129	0.5702	0.541582
Arhgef7	0.624109	0.628829	0.614544
Eif2c2	0.623366	#Δ/Y	0.779631
Prrc2c	0.623268	#Δ/Y	0.898077
Herc2	0.623205	0.714946	0.734456
Xrn1	0.62312	#Δ/Y	0.938364
Car14	0.622518	0.658101	0.710995
Hipk2	0.62225	#Δ/Y	0.952954
Atxn7	0.621747	#Δ/Y	0.764069
4931406P16Rik	0.62154	0.548607	0.50975
Dlc1	0.621238	0.647734	0.632488
Tjp1	0.620334	#Δ/Y	0.805116
Ifi44	0.619783	#Δ/Y	0.780794
Cdk5rap2	0.619753	0.561954	0.73811
Htt	0.619467	#Δ/Y	0.86823
Mid2	0.617789	0.537266	0.718957
Syne1	0.617362	0.669375	0.659562
Crim1	0.615604	#Δ/Y	0.582509
Neb	0.613954	#Δ/Y	0.881714
Nid2	0.613726	0.571538	0.631711
B4galt5	0.613576	0.478382	0.589014
Nfat5	0.610405	#Δ/Y	0.788871
Tnks	0.607546	#Δ/Y	0.917968
Lzts2	0.607362	0.623215	0.490715
Tet2	0.606481	#Δ/Y	0.676996
D730040F13Rik	0.604121	#Δ/Y	0.846458
Srd5a1	0.603875	0.485136	0.644335
Col15a1	0.60382	#Δ/Y	0.744692
Tbc1d16	0.603769	0.501778	0.702394
Ncoa3	0.602902	#Δ/Y	0.613738
Cul9	0.602087	#Δ/Y	0.607545
Caskin2	0.60015	0.585153	0.49708
D1Ert622e	0.600013	0.565687	0.68695
Slco2a1	0.599933	0.483891	0.616701
Mll3	0.599384	0.679286	0.842863
Utp20	0.599022	#Δ/Y	0.882306

Stx2	0.59892	0.475168	0.545921
Adamts7	0.598624	0.457352	0.390943
Hrsp12	0.598566	0.466866	0.527154
Smg1	0.598491	0.67706	0.802946
Shroom3	0.59817	0.637083	0.71971
Rps6ka3	0.598044	#Δ/Y	0.675191
Smchd1	0.596942	#Δ/Y	0.823743
Nrp2	0.596643	#Δ/Y	0.587812
Rhoc	0.596384	0.622203	0.444116
Nfya	0.595954	0.605606	0.645909
Deptor	0.595186	#Δ/Y	0.942507
Socs5	0.594646	0.487929	0.648157
Prkd2	0.594131	#Δ/Y	0.600767
Nbeal1	0.592504	#Δ/Y	0.883562
Kifc3	0.592106	#Δ/Y	0.634722
Itga1	0.591278	0.546426	0.692133
Ftcd	0.589738	0.45762	0.565383
1700024P16Rik	0.587658	0.339049	0.553151
Mycl1	0.586013	0.575263	0.575369
Myst3	0.585939	#Δ/Y	0.749495
Csf1	0.58498	#Δ/Y	0.537793
Synj1	0.583947	0.558483	0.730725
Vps13c	0.58351	0.683198	0.793356
Vps13a	0.583394	0.636915	0.708317
Slc41a2	0.582559	#Δ/Y	0.852958
Tecpr1	0.581664	0.638608	0.65718
Tm4sf1	0.579866	0.527123	0.505029
Mll1	0.579238	0.656755	0.705717
Tns3	0.575144	0.503167	0.550389
Ubn2	0.573307	#Δ/Y	0.987638
Ssh2	0.573021	#Δ/Y	0.621813
Itih5	0.57188	0.596048	0.682851
Cpd	0.570687	0.661668	0.733426
Nr2c2	0.569804	#Δ/Y	0.843397
Atp7a	0.567945	#Δ/Y	0.757733
Ralgapb	0.566906	0.587977	0.82366
Abca7	0.566389	0.461708	0.407968
Amdhd1	0.564877	0.474312	0.583686
Tead1	0.563466	0.574549	0.726396
Plxnb1	0.563381	0.509466	0.627204
Lass6	0.562768	0.563149	0.732026
Zap70	0.559086	0.495804	0.520045
Tgfb3	0.558931	#Δ/Y	0.537396
Hbegf	0.557036	0.478884	0.346295

Wwc2	0.556982	0.598471	0.550436
Kit	0.556614	0.623536	0.442252
A1bg	0.556576	0.340323	0.49016
Hapln4	0.556523	0.527673	0.712689
Tle4	0.556075	0.50019	0.503275
Vwf	0.55592	0.449719	0.249531
Atp2b2	0.555891	0.342384	0.587329
Atrx	0.555598	0.667569	0.783155
Ankrd32	0.555239	#Δ/Y	0.716521
Tanc1	0.554778	0.525452	0.531151
Tubgcp6	0.552948	#Δ/Y	0.779315
Jub	0.551466	#Δ/Y	0.664443
Tbc1d4	0.551	#Δ/Y	0.498567
Megf8	0.550838	0.512292	0.601592
Mycbp2	0.550689	0.600793	0.671964
Tgfbr2	0.550139	0.479325	0.428849
Myh10	0.549956	0.656749	0.772969
Fmo3	0.547443	0.407691	0.532275
Trove2	0.547281	#Δ/Y	0.685346
Aspg	0.54562	0.385781	0.503942
Pkd1	0.544066	0.570406	0.614284
Tagln2	0.543583	0.442835	0.322686
Spnb2	0.540076	0.552438	0.57882
Fat1	0.540054	0.643419	0.754153
Tbc1d30	0.539275	#Δ/Y	0.672339
Msrb3	0.538336	0.513877	0.469713
Arhgap6	0.535981	0.562287	0.624039
Herc3	0.534009	#Δ/Y	0.64553
Ank3	0.532716	0.410885	0.567846
Slc40a1	0.53252	0.46644	0.548552
Arhgef10	0.531964	0.401814	0.384278
F830016B08Rik	0.531936	#Δ/Y	0.942807
Engase	0.531069	#Δ/Y	0.527949
Lamc1	0.529989	0.42443	0.431476
Mdn1	0.528733	0.526606	0.737255
Ankrd50	0.528344	0.36066	0.38968
Pls1	0.528234	#Δ/Y	0.641141
Cep170	0.525876	#Δ/Y	0.723818
Mkl1	0.525694	#Δ/Y	0.58996
Il6st	0.525314	0.551905	0.504527
Phldb1	0.523504	0.41288	0.370264
Fmn12	0.521994	0.509476	0.482806
Evc2	0.520169	0.413963	0.435449
Mesdc1	0.516576	#Δ/Y	0.346093

Serpina3g	0.515834	0.331879	0.370362
Gltscr1	0.51571	#Δ/Y	0.620752
Rab23	0.515515	0.524244	0.668907
Tshz2	0.51361	#Δ/Y	0.730555
Zbtb4	0.513567	0.575155	0.494339
Luzp1	0.511955	0.536398	0.575537
Hmbox1	0.511794	#Δ/Y	0.910607
Mapre2	0.509764	0.392113	0.39533
Zswim6	0.509559	#Δ/Y	0.419776
Zfp182	0.507969	#Δ/Y	0.915675
Wdfy3	0.50708	0.669126	0.733149
Cntln	0.506481	#Δ/Y	0.449025
6330416G13Rik	0.505622	0.35093	0.489658
Cyb5d1	0.505293	#Δ/Y	0.672994
Dip2b	0.504032	0.57271	0.611424
Fam65a	0.500645	0.626942	0.527808
Fndc3b	0.500553	0.507703	0.550667
Dab2ip	0.500427	0.560752	0.540194
Gbp9	0.497617	#Δ/Y	0.422404
Nin	0.497046	#Δ/Y	0.377126
Macf1	0.496893	0.544051	0.567244
Lrrc8c	0.496857	0.384477	0.371347
Cav2	0.495007	0.47354	0.264051
Plscr3	0.493226	#Δ/Y	0.502609
Ephb4	0.492968	0.522339	0.470923
C230081A13Rik	0.492191	#Δ/Y	0.498766
Etv5	0.490787	0.395087	0.54652
Sh3bgrl3	0.489892	0.517408	0.410722
Pkd2	0.488514	0.488827	0.519511
Trim56	0.487687	#Δ/Y	0.710527
Pfas	0.487409	#Δ/Y	0.833935
Adrbk2	0.485579	0.405052	0.520523
Zbed6	0.484063	#Δ/Y	0.818261
Pacs1	0.483834	#Δ/Y	0.620991
Dct	0.483423	0.346548	0.367779
Nr4a3	0.480248	#Δ/Y	0.36213
Arsg	0.479628	0.45527	0.631078
Rab3il1	0.479297	#Δ/Y	0.268878
Esr1	0.479196	0.435169	0.628643
Fcgr2b	0.478114	0.407431	0.330041
Slc22a7	0.47735	#Δ/Y	0.610079
Pot1b	0.477144	#Δ/Y	0.616573
Maf	0.476909	0.463986	0.382306
Ccl3	0.476784	#Δ/Y	0.389308

Abcb1a	0.475737	0.411795	0.463423
Fzd4	0.475667	#Δ/Y	0.610743
Lnpep	0.475275	0.587084	0.809036
Lrch3	0.473413	0.515269	0.616182
Peg13	0.473257	0.405252	0.418582
Lix1l	0.472691	0.429068	0.441862
Tmem106a	0.472077	#Δ/Y	0.398621
Cdh13	0.471936	0.31327	0.288721
Ak4	0.471817	0.3635	0.457257
Plac8	0.470964	#Δ/Y	0.489364
Irf5	0.470768	0.498982	0.477738
Gab2	0.470716	0.334681	0.31609
Scarf1	0.470417	0.543321	0.504367
Rasgrp2	0.47038	0.392526	0.410633
Xpo4	0.469066	#Δ/Y	0.887344
Bmpr2	0.467955	0.489586	0.636623
Al607873	0.465873	0.406619	0.404767
Cmtm4	0.465086	0.442601	0.632691
Tmppe	0.464965	0.464375	0.651741
Gsta2	0.464511	0.328509	0.385236
Atp8a1	0.462835	#Δ/Y	0.488795
Fam125b	0.461892	#Δ/Y	0.424951
Gp49a	0.461473	0.366814	0.415936
Pak1	0.461096	0.421401	0.470286
She	0.460331	0.389886	0.260804
Vcam1	0.459833	#Δ/Y	0.380448
Fam38a	0.459743	0.349726	0.323353
Tmem2	0.458768	0.353596	0.33357
Nhsl2	0.458761	#Δ/Y	0.279334
Gldc	0.45854	0.336966	0.469086
Clca1	0.45594	0.260775	0.193332
Mansc1	0.45548	0.433892	0.442395
Myo10	0.454294	0.421136	0.491834
Anxa1	0.452905	0.251673	0.286763
Mnda	0.452294	0.281247	0.210709
Pkm2	0.45156	0.369189	0.388329
Ptger4	0.451531	#Δ/Y	0.188468
Akap12	0.451311	0.378446	0.295428
Mlxip	0.451293	0.464156	0.361415
Oasl2	0.450487	#Δ/Y	0.413435
Inhbb	0.450141	#Δ/Y	0.21293
Ttc28	0.45001	0.422082	0.278623
Esam	0.449259	#Δ/Y	0.292368
Tcf7l1	0.448871	0.376298	0.258314

9930111J21Rik1	0.448603	0.266727	0.376681
Sgce	0.446056	#Δ/Y	0.532427
Fscn1	0.44589	0.338759	0.179435
Ecscr	0.445301	0.309426	0.274721
Unc13d	0.44442	#Δ/Y	0.342773
Plcb4	0.44436	0.429119	0.323181
Akt3	0.443567	0.360372	0.321649
Tmem47	0.44315	0.290242	0.195111
Wfdc2	0.442738	0.445148	0.403391
Pecam1	0.442514	0.403067	0.295428
Tfpi	0.441462	0.39416	0.364679
Ugt1a9	0.441154	0.341448	0.41548
Ankrd12	0.441018	#Δ/Y	0.675754
Tnfsf10	0.43899	0.431606	0.544057
Golm1	0.438111	0.387433	0.364929
Cnn2	0.437869	#Δ/Y	0.288622
Gbp8	0.435324	0.341255	0.470921
Gbp4	0.433525	0.425014	0.475479
Ctdspl	0.433435	0.318929	0.335653
Zfhx2	0.433401	0.576342	0.623907
Nhsl1	0.431607	0.565922	0.645625
Lair1	0.429586	#Δ/Y	0.376174
Shank3	0.428752	0.437601	0.318721
Oas1a	0.427961	0.448847	0.409005
Olfm1	0.427823	0.333854	0.290499
Eif2c3	0.42773	#Δ/Y	0.656008
Acpp	0.427288	0.248963	0.42384
Ppic	0.427155	#Δ/Y	0.23373
Ntn4	0.426641	0.304287	0.254153
Lama4	0.425866	0.41691	0.359079
Ifi205	0.424467	0.229218	0.290349
Stab2	0.422995	#Δ/Y	0.33762
Pfkp	0.420232	0.405936	0.413423
Nxn	0.419571	0.296638	0.223847
Ushbp1	0.419313	0.333075	0.250552
Il33	0.418602	0.32601	0.254969
Casp1	0.418364	0.306063	0.308437
Prkch	0.418275	0.404168	0.291616
Ifi203	0.41814	0.389542	0.363478
Myo7a	0.416231	0.358461	0.325235
9430020K01Rik	0.415797	0.315972	0.363607
Casp4	0.41577	0.385008	0.354728
Ddah2	0.415538	0.408396	0.324963
Lass5	0.414108	#Δ/Y	0.431607

Lass4	0.413257	#Δ/Y	0.193761
Sp100	0.413122	0.363024	0.287483
Tek	0.41296	0.36164	0.331714
Arhgef6	0.412916	#Δ/Y	0.354363
Hsd17b13	0.412747	0.235357	0.351799
Gpr126	0.412714	0.320073	0.270544
Gas2	0.412379	0.309122	0.416574
Gm7609	0.412245	0.328073	0.271516
Sh3tc2	0.411582	0.302261	0.306261
Gpc1	0.411569	0.285724	0.262566
Arhgap27	0.410896	#Δ/Y	0.189868
App	0.410739	0.384409	0.358221
Rasal2	0.409832	0.518423	0.5688
Zfp90	0.409602	#Δ/Y	0.407743
Unc5b	0.409354	#Δ/Y	0.567267
Hecw2	0.408514	0.393468	0.355699
Ifi204	0.408332	#Δ/Y	0.388951
Apaf1	0.408218	0.326385	0.353865
Galnt4	0.40802	0.327794	0.282855
Slfn5	0.405917	0.330499	0.341222
Slc16a6	0.40574	0.246057	0.394253
Sfxn1	0.404596	0.254143	0.414746
Cmtm7	0.404372	0.19826	0.360544
Hpse	0.404372	0.324929	0.263019
Ddx26b	0.402963	#Δ/Y	0.473079
Zbtb46	0.402786	0.427661	0.327477
Sema6a	0.401808	#Δ/Y	0.279782
Stab1	0.401202	0.350825	0.280741
Pmp22	0.401115	0.282428	0.303672
Gm11437	0.399684	0.251905	0.501332
Fmn13	0.39821	0.317226	0.309187
Lst1	0.397842	0.204423	0.423301
Pcdhgc3	0.396651	0.301799	0.290723
Fcer1g	0.396564	#Δ/Y	0.372256
Mndal	0.396411	0.349922	0.419181
Tlr4	0.396372	0.25355	0.271262
Zfp532	0.39634	#Δ/Y	0.620633
Mef2c	0.394611	0.333762	0.369058
Itga8	0.394254	0.367054	0.280806
Clec4n	0.394185	#Δ/Y	0.434087
Csf2rb2	0.392795	#Δ/Y	0.233495
Flt4	0.392707	0.343924	0.251163
Pde1b	0.392485	0.213118	0.163612
Hcls1	0.391466	#Δ/Y	0.363899

Trim35	0.390539	#Δ/Y	0.330606
Rnf157	0.390112	0.367067	0.180235
Eltd1	0.389964	#Δ/Y	0.281604
Bgn	0.389282	0.30716	0.221185
Gls2	0.38816	0.257939	0.405849
Tgfb1	0.387103	0.373648	0.284572
Fcgr4	0.386809	#Δ/Y	0.43701
Abhd2	0.385229	0.349232	0.479339
Celsr1	0.384545	0.330345	0.497843
Flt1	0.384008	0.352844	0.300589
Rcsd1	0.383182	0.332691	0.254555
Rcan3	0.382354	#Δ/Y	0.36167
Mecom	0.382201	0.198369	0.330538
Igf1r	0.3808	#Δ/Y	0.354087
Sp110	0.38043	0.348642	0.398792
Marco	0.380251	#Δ/Y	0.403816
Lcp2	0.379747	0.358461	0.327896
Impdh1	0.379353	0.360696	0.405467
Notch4	0.3793	0.371592	0.257819
Zfp750	0.379069	0.257042	0.474075
Ltbp4	0.379003	0.28866	0.21158
Stox2	0.378977	0.328724	0.324324
Gja1	0.378639	0.368591	0.266329
Loxl2	0.377881	0.309915	0.270176
Flna	0.377634	0.3276	0.337887
Slc25a4	0.376912	0.325394	0.299193
Plxnc1	0.376868	0.326322	0.314006
Kdr	0.376753	0.323977	0.272778
Pde4a	0.376463	0.298339	0.264724
F8	0.376384	0.350247	0.345533
Slc44a2	0.37585	#Δ/Y	0.283504
Slc34a2	0.374735	#Δ/Y	0.348879
Calcr1	0.374597	0.332197	0.296945
Fam198a	0.37413	0.280756	0.465938
Arhgap31	0.372664	0.348359	0.274998
Gng2	0.370592	0.362952	0.336241
Plscr4	0.370136	0.214762	0.241929
Mfge8	0.369813	0.386489	0.301802
Slc38a1	0.369044	#Δ/Y	0.524722
Slc25a24	0.367665	#Δ/Y	0.485096
Cmtm3	0.367477	#Δ/Y	0.213347
Fam102b	0.366444	0.268151	0.225371
Bmp6	0.365549	0.26641	0.253549
Efnb2	0.365449	#Δ/Y	0.262055

Clec4a1	0.364873	#Δ/Y	0.401234
Slc43a2	0.364817	#Δ/Y	0.296145
Mfsd10	0.362391	0.353046	0.456875
Lpcat1	0.359379	#Δ/Y	0.197574
Pmepa1	0.358738	0.224179	0.255114
Fam189a2	0.358422	0.416441	0.26669
AU021092	0.357482	0.304686	0.182072
Hgf	0.357312	0.233569	0.247436
Ptprb	0.357006	#Δ/Y	0.293449
Bend4	0.356661	#Δ/Y	0.323417
Sulf2	0.356201	0.210936	0.341166
Scd2	0.35618	0.303195	0.425247
Adam23	0.355924	0.353725	0.265671
Smtn	0.355596	#Δ/Y	0.248889
Wdr47	0.355511	#Δ/Y	0.596659
Orai2	0.35413	#Δ/Y	0.54413
Nav1	0.352451	0.282417	0.245454
Ank2	0.352296	#Δ/Y	0.617051
Plvap	0.352072	0.310195	0.205268
Pcdh17	0.351257	0.320071	0.197085
Hspg2	0.350954	0.313488	0.268125
Sh3tc1	0.350615	0.356517	0.244807
Hdac7	0.350266	0.294882	0.231203
Prrg1	0.349969	#Δ/Y	0.231407
Kitl	0.348723	0.31129	0.328415
Cbl	0.348608	0.337215	0.451088
Rab31	0.348464	#Δ/Y	0.304734
Pear1	0.347607	0.306843	0.216447
Slc12a5	0.347355	0.27452	0.284922
Col6a3	0.347101	0.131933	0.143381
Sept4	0.34702	0.289992	0.193593
Kcnb1	0.34608	0.379428	0.225019
Lrrc32	0.346076	0.312681	0.275652
Btk	0.345906	0.224666	0.383639
Bdh2	0.345321	0.229381	0.398043
Klhl4	0.344939	#Δ/Y	0.394526
Atp2b4	0.343757	0.309802	0.330923
Ntng2	0.342882	#Δ/Y	0.360251
Rgl1	0.342242	#Δ/Y	0.276596
Tstd1	0.342241	0.193611	0.317373
Mmd2	0.341957	0.280096	0.398058
Adamts9	0.341934	#Δ/Y	0.468284
Pydc3	0.341851	0.338673	0.339592
D830031N03Rik	0.341746	#Δ/Y	0.533251

Btbd11	0.340587	#Δ/Y	0.471125
Hspa12a	0.339329	0.388096	0.260231
Heg1	0.339012	0.342932	0.367793
Stx11	0.338901	0.319002	0.255407
Adamtsl4	0.338741	0.299345	0.388867
Sirpa	0.338549	#Δ/Y	0.317597
Dbn1	0.338354	0.223233	0.28093
Hic1	0.336733	#Δ/Y	0.206378
Gdpc5	0.335804	#Δ/Y	0.306985
Hspa12b	0.335704	0.140682	0.224955
Kazn	0.33565	0.367687	0.19643
Ednrb	0.335454	#Δ/Y	0.181639
Dcn	0.3328	0.271705	0.216346
Tll7	0.332693	0.32471	0.52452
Armcx1	0.331767	#Δ/Y	0.316354
Hsd17b6	0.331705	0.19008	0.285088
Dchs1	0.33157	0.264824	0.193661
Fgr	0.331083	#Δ/Y	0.417621
Fam111a	0.330072	#Δ/Y	0.31406
Stap1	0.329056	#Δ/Y	0.415032
Clec9a	0.328008	0.218787	0.172852
Fhl1	0.327475	0.36844	0.201333
Irgb3	0.327216	0.340216	0.225681
Tnfrsf21	0.326811	#Δ/Y	0.295295
Sdsl	0.326657	0.212659	0.316491
Lama5	0.326255	#Δ/Y	0.349347
Dock10	0.325937	#Δ/Y	0.326192
Kcnk13	0.32542	#Δ/Y	0.251215
Abcc5	0.324079	#Δ/Y	0.306229
Dip2a	0.323314	0.375139	0.417373
Tbx20	0.323079	0.133351	0.115668
Myo1g	0.321477	0.327447	0.304165
Angptl2	0.320708	0.237678	0.126017
Ptpn14	0.320462	#Δ/Y	0.323413
Plcb2	0.319481	#Δ/Y	0.393474
Gucy1b3	0.319383	0.241127	0.190512
Nid1	0.318829	0.266597	0.256866
9830001H06Rik	0.318678	0.283797	0.27237
Gimap1	0.317745	#Δ/Y	0.148993
Fam49a	0.316727	#Δ/Y	0.316593
Rilpl1	0.316238	0.262822	0.32411
Chst12	0.31374	0.274786	0.23888
Dll4	0.313588	#Δ/Y	0.187913
St6galnac4	0.31244	0.246742	0.300404

Ptpre	0.311794	0.40815	0.415031
Armcx4	0.311703	#Δ/Y	0.314859
1810046K07Rik	0.311681	0.353633	0.426697
Gata2	0.311543	0.252794	0.34284
Sult5a1	0.309855	#Δ/Y	0.392741
Stxbp1	0.309206	0.307241	0.267001
Rnasel	0.308835	#Δ/Y	0.351409
Tmem26	0.308024	0.22005	0.313101
Tbxas1	0.307632	0.270198	0.387569
Fgfr1	0.307072	0.315453	0.356649
Dok2	0.306946	#Δ/Y	0.286495
Galntl2	0.306497	0.20159	0.12302
Cyp17a1	0.305676	0.202817	0.308893
Fam46c	0.304845	0.242265	0.310124
Ctsc	0.304742	0.208627	0.283205
Gramd1b	0.304294	#Δ/Y	0.373137
Osbp2	0.303197	0.286904	0.176481
Prelp	0.302935	0.274248	0.212127
Nova2	0.301935	0.265466	0.29973
Ptgds	0.301347	0.186155	0.398371
Rapgef3	0.301206	0.350097	0.30651
Lrrk2	0.301072	0.237196	0.173037
Kif26a	0.301042	#Δ/Y	0.290174
Dhrs9	0.299712	0.314308	0.419326
Sod3	0.298959	0.167507	0.129765
Rapgef5	0.297979	0.373912	0.251844
Papln	0.297969	0.123354	0.268224
Itrip	0.297788	0.341402	0.270505
Clec1a	0.297534	#Δ/Y	0.267402
Sema3d	0.296964	0.255198	0.260057
Tuba1a	0.296585	0.311979	0.301574
Tiam2	0.296215	0.181162	0.285816
Zmynd15	0.294973	0.270711	0.365409
Gnb4	0.294139	0.254487	0.241208
Igsf10	0.292498	#Δ/Y	0.188492
Ncf4	0.291989	0.225361	0.265804
Sash3	0.291498	#Δ/Y	0.306647
Prex2	0.291441	0.281041	0.286225
Serpina12	0.289529	0.200774	0.300807
Smpd3	0.289003	0.120898	0.360811
Plxdc1	0.288457	0.289943	0.327924
Plxna2	0.287576	0.218431	0.343793
Oas1g	0.28661	0.278064	0.366092
Cdk14	0.283152	#Δ/Y	0.406534

Cyb561	0.282283	0.382071	0.360631
Sept8	0.28198	0.367501	0.220171
Pydc4	0.280459	#Δ/Y	0.260924
Mmp2	0.277989	0.119335	0.116791
Cyyr1	0.277579	0.313493	0.260626
Cyp2f2	0.276921	0.151844	0.251622
Ednra	0.276907	0.235231	0.161916
Maml2	0.276735	0.306788	0.201972
Gpr114	0.275517	#Δ/Y	0.417354
Ecm1	0.273423	0.24881	0.177135
Fbn1	0.27341	0.249774	0.100098
Sparcl1	0.273072	0.227217	0.171854
Aim1l	0.272696	0.25667	0.366958
Cdc42ep3	0.271909	#Δ/Y	0.282144
Gucy2c	0.270689	0.128977	0.22994
Amotl1	0.270605	0.300462	0.323861
Cachd1	0.270061	0.157673	0.175125
Pdgfra	0.268221	#Δ/Y	0.185394
Disp2	0.266322	0.188948	0.209639
Sox4	0.264212	#Δ/Y	0.569035
Nynrin	0.26404	0.348409	0.224667
Ncam2	0.262828	#Δ/Y	0.475599
Aldh18a1	0.262348	#Δ/Y	0.363782
Slc3a1	0.26199	0.160566	0.288325
Adamts14	0.259679	#Δ/Y	0.171846
Dpysl3	0.257943	0.331078	0.312787
Cib3	0.257911	0.236278	0.161747
Ctnnbip1	0.257071	0.18654	0.237631
Hal	0.256771	0.171662	0.271029
Ramp1	0.256763	#Δ/Y	0.241176
Olfm3	0.256087	0.061443	0.237715
Agxt2l1	0.248777	0.15865	0.25944
Sds	0.248455	0.150653	0.238455
Clic5	0.247156	0.273687	0.588744
Mtap1b	0.24711	0.096839	0.278754
Tgfb1i1	0.246772	0.338037	0.14783
Reck	0.245855	0.141235	0.210133
Col6a1	0.24541	0.306238	0.205718
Reln	0.242317	0.255527	0.199821
Pamr1	0.241925	#Δ/Y	0.744378
Gdf2	0.241778	0.215945	0.159669
S1pr3	0.24146	0.172899	0.242033
Rtn1	0.240775	#Δ/Y	0.242345
Setd7	0.240443	0.239083	0.315718

Mgat4a	0.240315	#Δ/Y	0.469629
Col14a1	0.23762	0.164037	0.136365
Kcna2	0.23446	#Δ/Y	0.270904
Ripk3	0.232335	#Δ/Y	0.264124
Pira2	0.231554	#Δ/Y	0.372547
6530402F18Rik	0.230374	0.230494	0.25938
Eml6	0.228556	0.432674	0.50406
Pth1r	0.228313	0.170648	0.151936
Trerf1	0.226369	#Δ/Y	0.281785
Kctd12b	0.226093	#Δ/Y	0.238359
Bmp5	0.22459	#Δ/Y	0.195492
Fat4	0.221719	0.2535	0.262517
Vipr1	0.219449	0.26076	0.173974
Abi3bp	0.218738	0.272757	0.203954
Abcc9	0.21865	0.237229	0.199526
Ccdc8	0.218228	#Δ/Y	0.399409
Ddr2	0.217695	0.129958	0.196478
Fam167a	0.216221	#Δ/Y	0.380639
Col5a1	0.215395	0.167236	0.09983
Colec10	0.210426	0.172512	0.158078
Hmcn1	0.209772	#Δ/Y	0.290503
Ms4a4c	0.20905	#Δ/Y	0.213462
Osbpl5	0.203694	0.158316	0.163875
Stambpl1	0.203092	0.128604	0.173899
Lmod3	0.202022	0.088369	0.223259
Cdh1	0.200189	0.214145	0.262992
Coro2b	0.199126	0.317295	0.278296
Lamb1	0.196708	#Δ/Y	0.152279
Fgfr2	0.196354	0.169972	0.226628
Corin	0.193567	0.316235	0.331245
Arhgap10	0.190392	0.144192	0.212674
Susd2	0.189364	#Δ/Y	0.136765
Defb1	0.189003	0.129313	0.168621
Nr2f1	0.188034	#Δ/Y	0.399822
Igf2bp2	0.187549	0.169193	0.230717
Ngp	0.187013	#Δ/Y	0.238185
Rnf150	0.1866	#Δ/Y	0.200069
Fpr2	0.185824	#Δ/Y	0.173587
Ms4a4d	0.180824	0.169761	0.15377
Cryl1	0.179373	0.088676	0.163297
Bmp10	0.177367	0.223176	0.107985
Afap112	0.170543	0.106504	0.191306
Il17rd	0.170197	#Δ/Y	0.522636
P2ry6	0.168514	#Δ/Y	0.218443

Adamtsl1	0.165844	0.117787	0.136062
Lama1	0.164116	0.065489	0.102833
Ttll3	0.160719	#Δ/Y	0.23351
Nlrp1b	0.160267	0.093951	0.160647
Rgs5	0.1602	0.210608	0.162638
Slc16a3	0.160174	#Δ/Y	0.178342
Adamts13	0.159729	0.261375	0.144993
Ms4a7	0.158893	#Δ/Y	0.326809
Fam83a	0.155399	0.181136	0.334521
Zfp366	0.153351	#Δ/Y	0.178428
Pdlim4	0.152151	0.153476	0.32851
Tnfrsf11b	0.148665	0.165723	0.170136
Pcdh18	0.13905	0.188731	0.082468
Clec2h	0.136679	0.104806	0.129601
Aqp4	0.134602	0.095798	0.104953
Nr1h5	0.134484	#Δ/Y	0.325169
Aldh1b1	0.12595	0.104262	0.162929
Eci3	0.121714	0.07377	0.134276
Ccr10	0.119489	0.035364	0.248421
Gpat2	0.118157	#Δ/Y	0.177582
Tead4	0.117775	0.152765	0.2024
Fhdc1	0.114171	#Δ/Y	0.294592
Lrfn4	0.089739	#Δ/Y	0.698726
Ccbe1	0.085178	0.251795	0.230488
Tox2	0.084926	#Δ/Y	0.196676
Gucy1a2	0.072209	0	0.066262
Adra2b	0.063617	0.220435	0.194278
Gnb5	0.059439	#Δ/Y	0.415026
B230378P21Rik	0.050097	#Δ/Y	0.08032
Hoxa4	0.044225	#Δ/Y	0.260382
Nrgn	0.044225	#Δ/Y	0.264567
B3galt5	0.042519	#Δ/Y	0.462327
Hs3st3a1	0.03224	0	0.453178
Hapln1	0.027081	#Δ/Y	0.467802
9130206I24Rik	0.026044	#Δ/Y	0

*Inf= γονίδια που ανιχνεύθηκαν μόνο στον υπο μελέτη πληθυσμό

**#Δ/Y= Δεν ανιχνεύθηκε

Παράρτημα II. Απεικόνιση των γονιδίων που και στις δυο μελέτες εκφράζονται στις ίδιες περιοχές του ήπατος (ηπατική φλέβα-central region, πυλαία φλέβα-portal region)

Periportal Zonated Genes			Pericentral Zonated Genes		
gene	log2FoldChange	pval	gene	log2FoldChange	pval
Atp1b1	-0.5254	0.03774568	Cyp2a5	3.590482	5.02E-40
Car14	-0.60362	0.020590919	Cyp2c38	3.248124	1.11E-27
Hnmt	-0.65166	0.034331153	Cyp2e1	2.964179	5.01E-32
Gusb	-0.6948	0.009445156	Cyp1a2	2.602666	2.55E-12
Ly6a	-0.827	0.039193986	Gstm2	2.243184	0.000382598
Rbp1	-0.89786	0.002038131	Ces2c	2.035401	0.028231616
Tm4sf1	-0.92379	0.009890811	Gstm3	1.934867	0.014776772
Acly	-0.95222	0.02992345	Cyp2g1	1.895327	0.003247169
Uroc1	-0.97604	1.11E-05	Cyp2c50	1.867131	3.98E-15
Tle4	-0.99945	0.000796955	Cyp2c54	1.594455	5.98E-12
Apoc2	-1.00149	3.98E-04	Gstm6	1.395979	2.65E-06
Slco2a1	-1.04725	9.34E-06	Por	1.328683	0.000687046
Ftcd	-1.12778	4.70E-06	Cyp2c29	1.109114	6.29E-07
Mapre2	-1.35066	1.98E-06	Gsta3	1.023462	8.01E-06
App	-1.37928	0.001758198	Sult1d1	0.769968	0.001377877
Apoa4	-1.40075	0.00105379	Gstm1	0.745233	0.04017231
Aqp8	-1.41355	6.41E-09	Sult1b1	0.711914	0.005258211
Dct	-1.52887	1.41E-05	Nt5e	0.587826	0.043568453
Gldc	-1.56932	8.07E-12	Slc1a2	4.381438	4.20E-10
Gsta2	-1.606	4.89E-05	Slc13a3	3.805496	1.32E-12
Gas2	-1.69375	8.44E-11	Oat	3.655075	4.35E-08
Bmp4	-1.70094	0.026463934	Tnfrsf19	3.411097	0.000466809
Mmd2	-1.83601	0.007657932	Glul	3.303949	3.83E-06
Slc13a2	-1.86751	0.008075158	Rhbg	3.281497	0.000689962
Sfxn1	-1.97629	4.08E-16	Rdh9	3.166971	1.59E-31
Hsd17b13	-2.08708	5.65E-12	Gulo	2.976236	7.08E-18
Cdh1	-2.22334	2.61E-10	Tbx3	2.606699	1.34E-06
Sdsl	-2.23339	8.25E-08	Lect2	2.43384	3.84E-19
Sulf2	-2.24512	4.24E-15	Npr2	2.389628	3.97E-17
Ctsc	-2.261	6.86E-22	Pfn2	2.158624	0.002137207
Serpina12	-2.31635	0.008074519	Slc1a4	2.155748	0.007228087
Hal	-2.54236	1.61E-29	Csad	2.126341	2.18E-05
Fgfr2	-2.55663	2.31E-22	Rnase4	2.019694	8.54E-07
Slc3a1	-2.63876	5.89E-21	Slc22a1	1.958411	1.10E-15
Cyp2f2	-2.71934	3.62E-18	Avpr1a	1.935529	2.51E-07
Sds	-2.7307	4.68E-12	Cldn2	1.711084	1.59E-06
Aldh1b1	-3.26171	8.50E-18	Egln3	1.710388	0.000616937
Aqp4	-3.38387	8.13E-08	1810058I24Rik	1.584515	4.08E-06
Cryl1	-3.49532	1.21E-26	Cyp2c39	1.461213	2.32E-05

Olfm3	-4.02461	3.36E-09	Ube2e2	1.457579	8.36E-07
			Slco1b2	1.453548	2.77E-10
			Blvrb	1.386921	2.82E-07
			Csrp3	1.315032	1.16E-06
			Aqp9	1.255707	4.91E-08
			Ahr	1.177494	0.000802577
			Ncald	1.111951	0.000159001
			Pdgfc	1.06715	0.036174777
			Nr1i3	0.998043	0.022861697
			Slc19a2	0.939075	8.21E-05
			Cdh2	0.833084	0.000577223
			Idh3a	0.824085	1.39E-03
			Dlat	0.733497	0.028969278
			Dhrs1	0.548542	0.027067984

Η έκφραση στη ζώνη γύρω από την πυλαία φλέβα αναπαριστάται με αρνητικές log2 τιμές, ενώ η έκφραση στη ζώνη γύρω από την κεντρική φλέβα αναπαριστάται με θετικές log2 τιμές.

Παράρτημα III. Απεικόνιση των νέων γονιδίων που ανιχνεύθηκαν να εκφράζονται σε διακριτές περιοχές του ήπατος

Periportal Zonated Genes			Pericentral Zonated Genes		
gene	log2Fold Change	padj	gene	log2Fold Change	padj
Alb	-0.780	0.050253609	Sp5	4.465	0.006526862
Acaca	-0.814	0.052579346	Susd4	4.410	4.33E-05
4931406P16	-0.866	0.091915861	Elovl3	4.242	5.11E-05
Rik					
Macf1	-0.878	4.67E-02	Lgr5	3.746	1.68E-07
St6gal1	-0.899	0.01643784	Hsd3b5	3.505	1.93E-04
Plxnb1	-0.973	0.016167816	Rcan2	3.500	5.13E-05
Fndc3b	-0.978	0.020643943	Lhpp	3.412	1.65E-28
Mug2	-0.999	0.002198346	Pcp411	3.135	1.42E-16
Bmpr2	-1.030	0.098391628	Nfe2l3	3.054	2.04E-07
Pkd2	-1.033	0.040990105	Sult3a1	2.858	0.001438956
Srd5a1	-1.044	0.006249785	Fam55b	2.818	2.47E-12
Hbegf	-1.062	0.076539446	Cib2	2.754	8.99E-06
B4galt5	-1.064	0.019594353	Slc22a29	2.682	0.018424226
Amdhd1	-1.076	0.001671239	Slco1a1	2.642	2.71E-13
Hrsp12	-1.099	0.000145625	Serpina7	2.639	4.83E-13
Slc40a1	-1.100	0.003921259	Cyp2a22	2.396	3.92E-06
Arsg	-1.135	0.027187106	Axin2	2.352	0.000818215
Adarb1	-1.156	8.75E-02	Esrrg	2.351	0.004642811
Esr1	-1.200	0.002346391	Endod1	2.294	0.000317673
Gbp4	-1.234	0.025527104	Fitm1	2.264	0.001141294
Lamc1	-1.236	0.006124658	Ang	2.250	0.00330424
Rasgef1b	-1.237	0.00027189	Cyp3a16	2.152	0.056071369
Myo10	-1.248	0.000376676	Cyp2c37	2.136	2.83E-15
Steap2	-1.251	1.76E-02	Cyp7b1	1.954	2.62E-08
Abcb1a	-1.280	0.017430902	E2f8	1.866	2.21E-06
Ank3	-1.283	0.000906403	Slc16a10	1.861	2.55E-10
Fmo3	-1.294	0.01895873	Rnf186	1.798	0.000501922
Adrbk2	-1.304	0.024520364	Pparg	1.755	0.002526652
Fmn1	-1.344	0.01485905	Cyp2c67	1.701	2.35E-07
Rasgrp2	-1.349	0.030028574	Car1	1.652	0.049813548
Aspg	-1.374	0.056351228	Notum	1.652	1.49E-07
Cyb561	-1.388	0.051368284	Adh4	1.568	4.16E-08
Akap12	-1.402	0.033258415	Fbxl21	1.562	0.053488729
Tcf7l1	-1.410	0.032388872	Fam82a1	1.534	0.009486799
Gja1	-1.440	0.010923348	Mup10	1.525	0.084052275
Itga8	-1.446	0.027121404	Hspb6	1.518	0.022419197
Ak4	-1.460	0.007402928	Tnfaip8l1	1.509	6.71E-04
Ankrd50	-1.471	0.076539446	Pfkfb3	1.502	5.11E-05

Abhd2	-1.518	4.06E-07	Akr1c6	1.485	4.07E-08
Atp2b2	-1.546	0.00689209	Slc16a11	1.462	0.00944728
Ugt1a9	-1.550	5.86E-08	Casc4	1.428	0.018035719
Itrip	-1.550	0.022419197	Serpina6	1.411	4.44E-06
A1bg	-1.555	8.15E-08	Rgn	1.398	4.66E-07
1700024P16 Rik	-1.560	0.023458475	Ccdc157	1.388	0.004750361
Serpina3g	-1.591	0.003739956	Fmo2	1.386	8.57E-05
Celsr1	-1.598	1.95E-05	Cyp3a11	1.364	0.000850645
Galntl4	-1.609	0.076539446	Pon1	1.345	1.00E-06
Apaf1	-1.615	0.01134245	Tlr5	1.340	0.07465664
Pcdh17	-1.644	1.09E-02	Cyp2c69	1.324	0.050253609
Ctdspl	-1.649	0.017642542	Ociad2	1.293	2.80E-03
Kitl	-1.684	0.030026027	Syt1	1.283	0.017117128
Escr	-1.692	0.066431089	Tsku	1.268	0.002070387
Stxbp1	-1.703	0.076939897	Hsd3b2	1.255	0.057129293
Pde4a	-1.745	0.094172509	Gbp10	1.242	0.002798829
Nxn	-1.753	0.073893382	Ugt3a1	1.228	0.000135778
Tmem47	-1.785	0.017642542	Tsc22d1	1.221	0.000521621
Gpc1	-1.807	0.011627099	Rnd1	1.207	0.000481704
Fam198a	-1.833	1.86E-06	Hip1r	1.168	0.004032119
Clca1	-1.939	0.076626447	D630039A03Rik	1.149	0.016925538
Gls2	-1.955	9.37E-08	Nrn1	1.132	0.000330101
Zfp750	-1.960	5.76E-06	Slc25a21	1.131	0.015137834
Gnb4	-1.974	0.060388617	4930420K17Rik	1.083	0.005231705
Acpp	-2.006	1.08E-06	Cyp27a1	1.064	0.00049768
Slc16a6	-2.023	0.061031767	Alas2	1.062	0.082460843
Fam46c	-2.045	0.00023318	Hsd3b3	1.047	0.002912222
Setd7	-2.064	5.64E-05	Plbd1	1.043	0.01878609
Bdh2	-2.124	1.00E-06	Prodh	1.014	0.08708586
Ifi205	-2.125	0.094197594	Car3	1.006	0.032724298
S100a9	-2.171	0.052579346	Phlda1	1.000	0.00699605
Plxna2	-2.195	5.60E-14	Saa1	0.985	0.088508953
Cyp17a1	-2.302	5.25E-19	Cyb5	0.982	0.002081093
Tstd1	-2.369	3.31E-09	Klf11	0.964	0.046715806
Hsd17b6	-2.395	0.018370729	Fam107b	0.955	0.013232166
Disp2	-2.404	0.045183246	Ugt2b1	0.949	0.002526652
Ctnnbip1	-2.422	6.70E-09	Sord	0.946	0.003803817
Ptgds	-2.425	0.010852098	Akr1c20	0.926	0.010466154
Tiam2	-2.465	0.021555948	Plk3	0.922	0.027180294
S1pr3	-2.532	0.017059533	Mgst1	0.911	0.006249785
Igf2bp2	-2.563	0.006640658	Cml2	0.903	0.004669013
Tnfrsf11b	-2.593	0.0883168	Saa2	0.903	0.037658131
Agxt2l1	-2.656	4.18E-26	Rdh16	0.887	0.023807164
Bmper	-2.788	0.010371976	AW112010	0.870	0.023807164

Arhgap10	-2.794	0.003501566	1500003O03Rik	0.867	0.016763413
Reck	-2.824	0.006074066	Tmem97	0.865	0.027819425
Tbx20	-2.907	0.050253609	Cyp2d40	0.865	0.046175418
Defb1	-2.951	7.32E-06	Hsd3b7	0.832	0.019385983
Gucy2c	-2.955	0.009588558	Inmt	0.828	0.040127816
Stambpl1	-2.959	0.000671281	Alad	0.816	0.039778239
Papln	-3.019	0.00699605	2810007J24Rik	0.811	0.019594353
Adamtsl1	-3.086	0.00395004	Mbl1	0.779	0.076186449
Clec2h	-3.254	0.002440297	Irs2	0.776	0.076626447
Eci3	-3.761	3.35E-18	Comt	0.764	0.061031767
			Hpd	0.751	0.081575792
			Atp11c	0.724	0.087518508
			Cdo1	0.721	8.41E-02
			Pah	0.720	0.07465664

Η έκφραση στη ζώνη γύρω από την πυλαία φλέβα αναπαριστάται με αρνητικές log2 τιμές, ενώ η έκφραση στη ζώνη γύρω από την κεντρική φλέβα αναπαριστάται με θετικές log2 τιμές.

Δημοσιεύσεις